

CORRELATION DU RATIO TAUX DE FUCOSE / TAUX DE GALACTOSE D'ANTICORPS ANTI RHESUS D ET ANTI HLA-DR AVEC L'ACTIVITE ADCC

## ANTICORPS PRESENTANT UN TAUX DE FUCOSE ET DE GALACTOSE OPTIMISE

- 5 La présente invention se rapporte à des compositions d'anticorps monoclonaux ayant une forte activité ADCC et dont le ratio taux de fucose/taux de galactose des structures glycaniques présentes sur leurs sites de glycosylation de la région Fc, est inférieur ou égal à 0,6. L'invention porte également sur des compositions pharmaceutiques comprenant lesdits anticorps monoclonaux ayant une forte activité effectrice.
- 10 L'immunothérapie passive, très répandue, est fondée sur l'administration d'anticorps, en particulier d'immunoglobulines de type IgG, dirigés contre une cellule ou une substance donnée. L'immunothérapie passive au moyen d'anticorps monoclonaux a donné des résultats encourageants. Toutefois, si l'utilisation d'anticorps monoclonaux
- 15 possède plusieurs avantages, comme par exemple une assurance de sécurité du produit quant à l'absence de contamination infectieuse, il peut en revanche s'avérer difficile d'obtenir un anticorps monoclonal efficace.
- 20 Les immunoglobulines de type G (IgG), sont des hétérodimères constitués de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères, liées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne est constituée, en position N-terminale, d'une partie variable spécifique de l'antigène contre lequel l'anticorps est dirigé, et en position C-terminale, d'une partie constante, médiatrice des propriétés effectrices de l'anticorps.
- 25 L'association des parties variables et des domaines CH<sub>1</sub> et CL des chaînes lourdes et légères forme les parties Fab, qui sont connectées à la région Fc (partie constante de la chaîne lourde) par une région d'une exceptionnelle flexibilité (région charnière) permettant ainsi à chaque Fab de se fixer à sa cible antigénique tandis que la région Fc reste accessible aux molécules effectrices telles que les récepteurs FcγR et le C1q.

La région Fc est constituée de 2 domaines globulaires nommés CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>. Les 2 chaînes lourdes interagissent étroitement au niveau des domaines CH<sub>3</sub> tandis qu'au niveau des domaines CH<sub>2</sub>, la présence, sur chacune des 2 chaînes, d'un *N*-glycane biantenné de type lactosaminique, lié à l'Asn 297, contribue à un écartement des 2 domaines.

De nombreuses études ont montré que la glycosylation de la région Fc est essentielle pour l'activité biologique des IgG, particulièrement pour la lyse cellulaire médiée par le complément (CDC) et la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC). Ainsi, il a été démontré que les IgG aglycosylées, obtenues soit par mutagenèse dirigée soit par culture des cellules produisant l'anticorps en présence de tunicamycine, perdent leur capacité à activer le complément et à fixer les récepteurs FcγR (Nose et Wigzell, 1983 ; Tao et Morrison, 1989).

15

Des études plus précises sur le rôle de chaque monosaccharide ont montré que l'attachement d'un résidu de *N*-acétylglucosamine (GlcNac) en position bissectrice conduit à améliorer l'activité ADCC des IgG (Umana et *al.*, 1999 ; Davies, 2001).

Par contre, l'effet de la présence ou non de résidus de galactose dans l'oligosaccharide lié à l'Asn297 est plus controversé. Si la présence de résidus de galactose a été décrite comme essentielle pour la fonction effectrice des IgG (Tsuchiya et *al.*, 1989 ; Furukawa et Kobata, 1991 ; Kumpel et *al.*, 1994), d'autres auteurs ont montré que l'absence de résidus de galactose ne modifiait pas l'activité fonctionnelle des IgG (Boyd et *al.*, 1995 ; Wright et Morrison, 1998).

25

Dans la demande de brevet WO 01/77181, nous avons démontré que la glycosylation de la région Fc est essentielle pour l'activité biologique des IgG, particulièrement pour les activités CDC et ADCC. Nous montrons qu'un *N*-glycane biantenné de type lactosaminique caractérisé par des chaînes courtes, une faible sialylation, une faible

fucosylation, des résidus de mannose terminaux et/ou des résidus de GlcNac terminaux non intercalaires est le dénominateur commun des structures glycaniques conférant une forte activité ADCC aux anticorps monoclonaux. Par la suite, notre découverte a été corroborée par les études de Shields et *al.* (2002) et Shinkawa et *al.* (2003).

5

Dans le cadre de la présente invention, nous avons observé que des anticorps polyclonaux anti-D thérapeutiques (NATEAD, WinRho) présentent une activité ADCC très forte compte tenu de leur forte teneur en fucose.

10 Cette observation implique que le faible taux de fucose n'est pas en soi le seul facteur qui influence la capacité des anticorps à activer les récepteurs FcγR, et notamment le FcγRIII.

15 En étudiant le profil glycosidique complet des anticorps polyclonaux, nous avons découvert une relation inverse entre le rapport [taux de fucose / taux de galactose] et l'activité effectrice des anticorps.

20 En effet, si l'anticorps est fortement fucosylé, il faut qu'il soit fortement galactosylé pour avoir une activité effectrice optimale. A contrario, si l'anticorps est faiblement fucosylé, le taux de galactose présent doit être tel que le ratio taux de fucose / taux de galactose est inférieur à 0,6 mais préférentiellement inférieur à 0,5 ou même inférieur à 0,4 pour avoir une activité effectrice optimale.

25 A la lumière de ces résultats expérimentaux, nous avons donc mis en place un procédé de préparation d'anticorps présentant un ratio taux de fucose / taux de galactose optimisé, ce qui permet l'obtention d'anticorps ayant une forte activité effectrice. En d'autres termes, nous proposons de nouveaux anticorps monoclonaux présentant une structure oligosaccharidique précise, notamment en ce qui concerne les résidus de fucose et de galactose, conférant une forte activité effectrice. D'autre part, nous

proposons également des anticorps dont la structure glycanique ne permet pas l'activation de l'activité cytotoxique ainsi que les procédés permettant de les obtenir.

### **Description**

5

Ainsi, dans un premier aspect, l'invention se rapporte à un procédé de préparation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain ayant une forte activité effectrice, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

10

a) production et purification d'anticorps monoclonaux obtenus à partir de différentes sources, notamment de cellules, plantes ou animaux non humains, éventuellement génétiquement modifiés ou transformés,

b) mesure du taux de fucose et du taux de galactose des structures glycaniques portées par les sites de glycosylation de la région Fc desdits anticorps,

15

c) sélection des anticorps dont le ratio taux de fucose / taux de galactose est inférieur ou égal à 0,6, préférentiellement à 0,5 ou à 0,4.

20

On entend par « un anticorps monoclonal », une composition comprenant des anticorps monoclonaux ayant une structure primaire identique, excepté la faible proportion d'anticorps présentant des mutations survenues naturellement, une spécificité identique et des modifications post-traductionnelles, notamment des modifications de la glycosylation, qui peuvent varier d'une molécule à l'autre. Aux fins de la présente invention, les expressions « anticorps monoclonal » ou « composition d'un anticorps monoclonal » sont synonymes.

25

Les anticorps monoclonaux de l'invention peuvent être préparés à l'aide de méthodes conventionnelles, telles que la production d'hybridomes comme décrit par Köhler et Milstein (1975), l'immortalisation de lymphocytes B humains par le virus d'Epstein-Barr (EBV), ou plus récentes, comme la technologie du "phage display", l'utilisation de librairie combinatoire d'anticorps humains ou d'animaux transgéniques, notamment la

souris Xenomouse® ; les anticorps monoclonaux peuvent également être préparés par ingénierie moléculaire, notamment pour chimériser ou humaniser les anticorps.

Aux fins de l'invention, l'analyse des glycanes peut être effectuée par exemple par HPCE-LIF (High-Performance Capillary Electrophoresis with Laser-Induced  
5 Fluorescence), ou grâce à toute autre méthode d'analyse des glycanes connue de l'homme du métier.

Le procédé selon l'invention permet l'obtention d'un anticorps monoclonal possédant une forte activité effectrice, et plus particulièrement une forte activité fonctionnelle de  
10 type ADCC. A ce titre, on entend par activité effectrice les activités biologiques attribuables à la région Fc d'un anticorps. Des exemples de ces fonctions effectrices incluent, sans y être limitées, l'activité ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity), l'activité CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity), l'activité de phagocytose, l'activité d'endocytose ou encore l'induction de la sécrétion de cytokines.

15

Par « forte » activité effectrice on entend une activité effectrice au moins 20 fois, 50 fois, 60 fois, 70 fois, 80 fois, ou 90 fois, et de préférence jusqu'à 100 fois, ou de manière préférentielle 500 fois supérieure à l'activité effectrice d'anticorps de même spécificité mais dont le ratio taux de fucose/taux de galactose est supérieur à 0,6.

20 De manière préférentielle, le ratio taux de fucose/taux de galactose se situe entre les valeurs 0,6 et 0,3, préférentiellement entre 0,5 et 0,35. En effet, au vu des expérimentations menées dans le cadre de l'invention, il apparaît qu'un ratio limite existe, c'est-à-dire un ratio taux de fucose/taux de galactose en dessous duquel l'activité fonctionnelle, notamment l'ADCC, n'augmente plus de manière linéaire à la  
25 diminution du ratio. Il est donc particulièrement avantageux de réaliser le procédé selon l'invention de manière à se situer entre ces limites.

Par exemple, si le taux de fucose se situe entre 35% et 45%, le taux de galatose peut être compris entre 70 et 99%. Si le taux de fucose se situe entre 20% et 35%, le taux de galatose est compris entre 55% et 70% ou même entre 60% et 99%.

Aux fins de l'invention, la valeur du « ratio inférieur ou égal à 0,6 » s'entend aussi d'une valeur supérieure à 0,6 de quelques centièmes d'unité, par exemple 4 à 5 centièmes.

5

Dans un aspect particulier de l'invention, les anticorps obtenus par le procédé selon l'invention sont produits dans des cellules modifiées génétiquement par introduction d'au moins un vecteur permettant l'expression des anticorps, ces cellules étant des cellules eucaryotes ou procaryotes, notamment des cellules de mammifères, d'insectes,  
10 de plantes, de bactéries ou de levures.

De manière avantageuse, l'anticorps obtenu est une immunoglobuline humaine de type IgG.

15 De manière particulièrement avantageuse, ces cellules peuvent être modifiées génétiquement par introduction d'au moins un vecteur permettant l'expression d'au moins un polypeptide possédant une activité glycosyltransférase.

Préférentiellement, cette activité glycosyltransférase est une activité galactosyltransférase, et notamment une activité beta(1,4)-galactosyltransférase  
20 ou beta(1,3)-galactosyltransférase.

Aux fins de l'invention, on entend par « polypeptide possédant une activité galactosyltransférase » tout polypeptide capable de catalyser l'addition d'un résidu de galactose à partir de l'UDP-galactose vers le résidu de GlcNAc en position non  
25 réductrice d'un *N*-glycane.

Aux fins de l'invention, on entend par « vecteur permettant l'expression d'un polypeptide possédant une activité beta(1,4)-galactosyltransférase » tout vecteur comprenant un polynucléotide permettant l'expression d'un polypeptide capable de

synthétiser le motif disaccharidique Galbeta(1,4)-GlcNac, ce polynucléotide pouvant provenir d'espèces comme l'homme, la souris, le hamster, la vache, le mouton, la chèvre, le cochon, le cheval, le rat, le singe, le lapin, le poulet par exemple. De telles séquences, comme par exemple NM 001497, AB 024434, NM 003780, BC 053006, XM 242992, NM 177512, cette liste n'étant pas exhaustive, sont disponibles dans des banques de séquences nucléotidiques et/ou protéiques comme Genbank.

Aux fins de l'invention, on entend par « vecteur permettant l'expression d'un polypeptide possédant une activité beta(1,3)-galactosyltransférase » tout vecteur comprenant un polynucléotide permettant l'expression d'un polypeptide capable de synthétiser le motif disaccharidique Galbeta(1,3)-GlcNac, ce polynucléotide pouvant provenir d'espèces comme l'homme, la souris, le hamster, la vache, le mouton, la chèvre, le cochon, le cheval, le rat, le singe, le lapin, le poulet par exemple. Notamment, les séquences codant pour une beta(1,3)-galactosyltransférase provenant d'espèces comme l'homme, la souris, le hamster, la vache, le mouton, la chèvre, le cochon, le cheval, le rat, le singe, le lapin, le poulet par exemple sont particulièrement adaptées. De telles séquences sont disponibles sur Genbank, comme par exemple NM020981, AB084170, AY043479, cette liste n'étant pas limitative.

Par « site de glycosylation de la région Fc des anticorps » on entend généralement les deux résidus d'Asn297 selon la numérotation de Kabat (Kabat database, <http://immuno.bme.nwu.edu>), mais l'invention vise également les anticorps dont les séquences en acides aminés ont été modifiées.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les cellules possèdent en outre une activité relative à la synthèse et/ou au transport du GDP-fucose et/ou l'activité d'une enzyme impliquée dans l'addition de fucose à l'oligosaccharide du site de glycosylation des anticorps diminuée ou délétée. De manière avantageuse, l'enzyme impliquée dans la synthèse du GDP-fucose est la GMD (GDP-D-mannose 4,6-déhydratase), la Fx (GDP-keto-6-déoxymannose 3,5-épimérase, 4-réductase) ou la

GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase), cette liste n'étant pas exhaustive. Avantageusement, l'enzyme impliquée dans l'addition du fucose est une fucosyltransférase. La protéine impliquée dans le transport du GDP-fucose peut avantageusement être le GDP-fucose transporter 1 humain.

5

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, il est possible, si les taux de fucose et de galactose mesurés à l'étape b) donnent un ratio supérieur à 0,6, de dé-fucosyler et/ou d'ajouter des résidus de galactose aux anticorps avant l'étape c), de manière à ce que ledit ratio devienne inférieur à 0,6 mais préférentiellement inférieur à 10 0,5 et même à 0,4 afin d'augmenter l'activité fonctionnelle des anticorps. Cette dé-fucosylation peut être effectuée par l'addition d'une fucosidase dans le milieu contenant l'anticorps, qui peut être le milieu de conservation. L'ajout de résidus de galactose peut être effectué par tout moyen approprié y compris l'addition d'une galactosyltransférase dans le milieu contenant l'anticorps ou dans une solution 15 contenant l'anticorps et un substrat donneur comme l'UDP-galactose, par exemple.

De manière avantageuse, les cellules utilisées pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention proviennent de lignées cellulaires animales ou humaines, ces lignées étant sélectionnées notamment parmi les lignées de myélomes de rat, notamment YB2/0 et 20 IR983F, de myélome humain comme Namalwa ou toute autre cellule d'origine humaine comme PERC6, les lignées CHO, notamment CHO-K, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO Pro-5, CHO dhfr-, CHO Lec13, ou d'autres lignées choisies parmi Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8.653.

25

Avantageusement, l'anticorps est un anti- Rhésus D (anti-D), anti-CD, anti-tumeurs, anti-virus, anti-CD20 ou un anti-HLA-DR, plus particulièrement parmi les anticorps du Tableau 0 ci-après :

30



Tableau 0 :

Nom et marque commerciale de l'anticorps	Société	cible	indication
Edrecolomab PANOREX	Centocor	anti Ep-CAM	cancer colorectal
Rituximab RITUXAN	Idec Licencié à Genentech/ Hoffman la roche	anti CD20	B cell lymphoma thrombocytopenia purpura
Trastuzumab HERCEPTIN	Genentech Licencié à Hoffmann la roche/Immunogen	anti HER2	cancer ovarien
Palivizumab SYNAGIS	Medimmune Licencié à Abott		RSV
Alemtuzumab CAMPATH	BTG Licencié à Schering	anti CD52	leukemia
ibritumomab tiuxetan ZEVALIN	IDEC Licencié à Schering	anti CD20	NHL
Cetuximab IMC-C225	Merck /BMS / Imclone	anti EGFR	cancers
Bevacizumab AVASTIN	Genentech/ Hoffman la roche	anti VEGFR	cancers

Epratuzumab	Immumedics/ Amgen	anti CD22	cancers: lymphome non hogkinien
Hu M195Mab	Protein Design Labs	Anti CD33	cancers
MDX-210	Immuno-Designed Molécules	ND	cancers
BEC2	Imclone	anti GD3	cancers
Mitumomab			
Oregovomab	Altarex	anti CA125	cancer ovarien
<i>OVAREX</i>			
Ecromeximab	Kyowa-Hakko	anti GD3	melanome malin
KW-2971			
ABX-EGF	Abgenix	EGF	cancers
MDX010	Medarex	Anti CD4R	Cancers
XTL 002	XTL biopharmaceuticals	ND	anti-viral : HCV
H11 SCFV	viventia biotech	ND	cancers
4B5	viventia biotech	anti GD2	Cancers
XTL 001	XTL biopharmaceuticals	ND	anti-viral : HBV
MDX-070	MEDAREX	Anti-PSMA	cancer de la Prostate
TNX-901	TANOX	anti IgE	Allergies
IDEC-114	IDEC	inhibition ProteinC	lymphome non-Hodgkinien

Cette liste n'est toutefois pas limitative.

Un deuxième objet de l'invention est de fournir un procédé pour augmenter l'activité effectrice, notamment l'activité ADCC, d'une composition de molécules immunologiquement fonctionnelles, comprenant l'augmentation du taux de galactose et/ou la diminution du taux de fucose de la composition de molécules.

5

Par « molécules immunologiquement fonctionnelles » on entend désigner des molécules capables de réagir à tout contact avec un immunogène quelconque en manifestant une capacité immunologique. Ces molécules peuvent présenter à l'état natif une bonne activité effectrice, par exemple ADCC, ou une mauvaise activité effectrice. Elles possèdent une région Fc comportant un site de glycosylation.

10

A cet effet, ces molécules fonctionnellement immunologiques sont préférentiellement des anticorps, avantageusement monoclonaux ou polyclonaux.

Les molécules peuvent posséder à l'état natif un fort taux de fucose. Plus particulièrement, il est avantageux dans ce cas d'effectuer une augmentation du taux de

15

galactose de ces molécules ou anticorps.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la diminution du taux de fucose est réalisée par une dé-fucosylation des molécules de la composition par action d'une fucosidase. Cette dé-fucosylation peut être effectuée par une  $\alpha$ 1,6 fucosidase. Les fucosidases extraites de rein de bovin ou de *Charonia lampas* ont cette spécificité.

20

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, l'augmentation du taux de galactose des molécules de la composition est due à une galactosylation de la composition par action d'une galactosyltransférase.

25

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, on fait agir à la fois des enzymes permettant la dé-fucosylation et des enzymes permettant la galactosylation.

De manière alternative au traitement enzymatique, on peut purifier la composition de molécules immunologiquement fonctionnelles grâce à une série de chromatographies sur lectines qui enrichissent la composition en anticorps faiblement fucosylés et/ou en anticorps fortement galactosylés.

5

A titre d'exemple, la solution comprenant la composition de molécules immunologiquement fonctionnelles, qui sont de manière avantageuse des anticorps, est passée sur une colonne de lectine (par exemple une colonne LA-LCA, ou LA-AAL, Shimadzu Corporation) connectée à un système HPLC. La solution est séparée en une fraction non-adsorbée et une fraction adsorbée. Une analyse des glycannes des fractions non-adsorbée et adsorbée est effectuée : les oligosaccharides, clivés de la partie protéique par action enzymatique, sont marqués avec l'APTS et sont séparés par HPCE-LIF et quantifiés. Les aires des pics sont calculées : les anticorps possédant des glycannes dépourvus de fucose peuvent être ainsi séparés et sélectionnés. On passe ensuite la fraction sélectionnée (qui peut être issue de la fraction non-adsorbée ou de la fraction adsorbée) soit sur une colonne hydrophobe de type Phenyl-5PW (préparée par Tosoh Corporation) soit sur une seconde colonne de lectine (LA-RCA 120 ou LA-WGA, Seikagaku America). On peut ainsi sélectionner de manière précise les fractions dont le ratio taux de fucose/taux de galactose est inférieur ou égal à 0,6.

20

Un troisième objet de l'invention est une cellule, de manière préférentielle dérivée de la lignée cellulaire YB2/0, dans laquelle au moins un vecteur codant pour une molécule d'anticorps est introduite, ladite cellule produisant un anticorps monoclonal possédant un ratio taux de fucose/taux de galactose des oligosaccharides du site de glycosylation de la région Fc inférieur ou égal à 0,6. Préférentiellement, ce ratio est inférieur à 0,5 ou encore à 0,4. Dans un aspect préféré de l'invention, ce ratio est compris entre 0,6 et 0,3.

25

Dans un aspect préféré de l'invention, cette cellule est transfectée par un vecteur d'expression codant pour une galactosyltransférase, notamment pour une beta(1,4)-

galactosyltransférase ou une beta(1,3)-galactosyltransférase. Avantageusement, cette cellule exprime ou sur-exprime une galactosyltransférase recombinante.

La lignée YB2/0 exprime naturellement des galactosyltransférases de la famille des beta(1,4) et beta(1,3). Par ailleurs, cette lignée cellulaire est connue pour produire des anticorps possédant un faible taux de fucose (WO 01/77181, LFB). Toutefois, la cellule selon l'invention a pour avantage de sur-exprimer la galactosyltransférase, ce qui a pour effet de faire varier le ratio taux de fucose / taux de galactose des anticorps produits par la cellule modifiée par rapport aux anticorps produits par la lignée non modifiée. Par conséquent, l'anticorps étant naturellement faiblement fucosylé, une augmentation de son taux de galactose baisse encore son ratio taux de fucose / taux de galactose, ce qui a pour effet d'optimiser encore son activité ADCC.

De manière avantageuse, la galactosyltransférase est codée par une séquence ayant pour origine l'homme, la souris, le hamster, la vache, le mouton, la chèvre, le cochon, le cheval, le rat, le singe, le lapin ou le poulet, cette liste n'étant pas limitative. Plus particulièrement, la séquence codante est la séquence NM 001497, AB 024434, NM 003780, BC 053006, XM 242992 ou NM 177512.

Ainsi, l'invention se rapporte également à un procédé de préparation d'anticorps monoclonal dont les structures glycaniques portées par le site de glycosylation de la région Fc possèdent un ratio taux de fucose/taux de galactose inférieur ou égal à 0,6, préférentiellement inférieur à 0,5 ou encore à 0,4 comprenant la culture de la cellule précédemment décrite dans un milieu de culture et à des conditions permettant l'expression desdits vecteurs.

Alternativement, on peut préparer des compositions d'anticorps telles que définies ci-dessus au moyen d'une ou plusieurs étapes de chromatographie en utilisant toute molécule capable de piéger avec spécificité le fucose, le galactose ou les oligosaccharides les comprenant. A ce titre, on peut utiliser la séparation sur lectine, comme illustrée ci-avant.

De même, l'invention se rapporte à des anticorps thérapeutiques ayant une forte activité effectrice, susceptibles d'être obtenus à partir des procédés précédemment décrits, ou encore obtenus à partir des procédés décrits, ces anticorps étant caractérisés en ce qu'ils présentent sur leur site de glycosylation de la région Fc, des structures glycaniques possédant un ratio taux de fucose / taux de galactose inférieur à 0,6, préférentiellement inférieur à 0,5 ou encore à 0,4.

De manière particulièrement avantageuse, il s'agit d'anticorps monoclonaux thérapeutiques susceptibles d'être obtenus à partir du procédé précédent, lesdits anticorps présentant une activité ADCC renforcée, à titre d'exemple des anti-D monoclonaux présentant une activité ADCC égale ou supérieure à celle des anticorps polyclonaux. Cette activité ADCC renforcée est au moins égale mais préférentiellement supérieure à celle de l'anticorps thérapeutique polyclonal ou monoclonal (de même spécificité) exprimé dans une lignée CHO DG44 ou DxBI1.

Avantageusement, il peut s'agir d'IgG, par exemple des IgG1 ou des IgG3, chimériques, humanisées ou humaines ou d'IgG ayant une région Fc humaine. Préférentiellement, ces anticorps sont des IgG humaines ou toute molécule chimérique comportant une région Fc humaine.

Dans le même ordre d'idée, l'invention se rapporte à une composition pharmaceutique comprenant un anticorps précédemment décrit.

De même, l'invention se rapporte à une composition pharmaceutique comprenant au moins 50%, préférentiellement 60%, 70%, 80% ou encore 90% ou 99% d'un anticorps monoclonal ou polyclonal dont les structures glycaniques portées par le site de glycosylation de la région Fc possèdent un ratio taux de fucose / taux de galactose inférieur à 0,6 préférentiellement inférieur à 0,5 ou encore à 0,4. De manière

préférentielle, le ratio se situe entre les valeurs 0,6 et 0,3, et plus particulièrement entre 0,5 et 0,35.

5 Les compositions selon l'invention comportent préférentiellement un anticorps dirigé contre un antigène normal non ubiquitaire, notamment un facteur Rhésus, comme le facteur Rhésus (D) du globule rouge humain, ou un antigène d'une cellule pathologique ou d'un organisme pathogène pour l'homme, en particulier contre un antigène d'une cellule cancéreuse. Les anticorps sont de plus préférentiellement des IgG.

10

Un autre objet de l'invention se rapporte à l'utilisation d'un anticorps selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de l'allo-immunisation, notamment la maladie hémolytique du nouveau-né.

15 Un autre objet de l'invention se rapporte à l'utilisation d'un anticorps selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies auto-immunes, des cancers et des infections par des agents pathogènes, notamment pour le traitement des maladies échappant à la réponse immune notamment choisie parmi le Syndrome de Sézary, les cancers solides, notamment dont les cibles antigéniques sont faiblement  
20 exprimées, notamment le cancer du sein, les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux biphényles polychlorinés, les maladies infectieuses, notamment la tuberculose, le syndrome de la fatigue chronique (CFS), les infections parasitaires comme par exemple les schistosomules, et les infections virales.

25 De plus, l'anticorps selon l'invention peut être utilisé pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers des cellules HLA classe II positives comme les mélanomes, les leucémies lymphoïdes aiguës des cellules B et T, les leucémies myéloïdes chroniques et aiguës, le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, les lymphomes des cellules T et les lymphomes non hodgkiniens.

30

Les anticorps de l'invention peuvent être sélectionnés parmi les anticorps figurant dans le tableau 0.

Avantageusement, l'anticorps est un anti-HLA-DR ou un anti-CD20.

- 5 Dans un autre aspect de l'invention, l'anticorps selon l'invention est utilisé pour la fabrication d'un médicament destiné à induire l'expression d'au moins une cytokine choisie parmi IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-18, IL-21, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IFN $\gamma$ , et IP10 par les cellules effectrices naturelles du système immunitaire, ledit médicament étant utile notamment pour le traitement du cancer et
- 10 des infections virales, bactériennes ou parasitaires.

- Dans un autre aspect particulier de l'invention, l'anticorps selon l'invention est utilisé pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de patients présentant un des polymorphismes du CD16, en particulier V/F158 ou F/F158, notamment des patients
- 15 se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

- Dans un aspect supplémentaire, l'invention se rapporte également à un procédé de préparation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain ayant une
- 20 faible activité effectrice, notamment une faible activité fonctionnelle de type ADCC, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) production et purification d'anticorps monoclonaux obtenus à partir de différentes sources, notamment de cellules, plantes ou animaux non humains, éventuellement génétiquement modifiés ou transformés,
- 25 b) mesure du taux de fucose et du taux de galactose des structures glycaniques portées par le site de glycosylation de la région Fc desdits anticorps,
- c) sélection des anticorps dont le ratio taux de fucose / taux de galactose est supérieur à 0,6, préférentiellement supérieur à 1,2.



A ce titre, les définitions de l'activité effectrice d'un anticorps monoclonal sont les mêmes que celles données précédemment.

De plus, par « faible activité effectrice » on entend une activité effectrice au moins 20 fois, 50 fois, 60 fois, 70 fois, 80 fois, ou 90 fois, et de préférence jusqu'à 100 fois, ou  
5 de manière préférentielle 500 fois inférieure à l'activité effectrice, notamment à l'activité fonctionnelle de type ADCC d'anticorps de même spécificité mais dont le ratio taux de fucose/taux de galactose est inférieur à 0,6.

Dans un aspect complémentaire, l'invention vise donc des anticorps ayant une faible activité ADCC, et les compositions les comprenant, caractérisés en ce que leur site de  
10 glycosylation (Asn 297) de la région Fc présente un ratio taux de fucose / taux de galactose supérieur à 1,2.

Ces anticorps sont utiles pour préparer des médicaments pour traiter et/ou prévenir les maladies auto-immunes, notamment le purpura thrombopénique immunologique (PTI),  
15 les allo-immunisations, le rejet de greffe, les allergies, l'asthme, les dermatites, les urticaires, les érythèmes, et les maladies inflammatoires.

Dans un aspect particulier de l'invention, les anticorps sont produits dans des cellules modifiées génétiquement par introduction d'au moins un vecteur permettant l'expression desdits anticorps, lesdites cellules étant des cellules eucaryotes ou  
20 procaryotes, notamment des cellules de mammifères, d'insectes, de plantes, de bactéries ou de levures.

Dans un mode de réalisation de l'invention, les cellules sont modifiées génétiquement par introduction d'au moins un vecteur permettant l'expression d'au moins un polypeptide possédant une activité glycosyltransférase, préférentiellement une activité  
25 fucosyltransférase et notamment  $\alpha$  1,6-fucosyltransférase.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, les cellules possèdent une activité relative à la synthèse et/ou au transport de l'UDP-galactose et/ou l'activité d'une enzyme impliquée dans l'addition de galactose à l'oligosaccharide du site de

glycosylation des anticorps est diminuée ou déléetée. Avantageusement, cette enzyme impliquée dans l'addition de galactose est une  $\beta$  1,4-galactosyltransférase.

5 Avantageusement, les cellules possèdent à la fois une activité glycosyltransférasique, préférentiellement une activité fucosyltransférasique et une activité relative à la synthèse et/ou au transport de l'UDP-galactose et/ou l'activité d'une enzyme impliquée dans l'addition de galactose à l'oligosaccharide du site de glycosylation des anticorps diminuée ou déléetée.

10 Dans un mode de réalisation de l'invention, on peut prévoir que si à l'étape b), le ratio mesuré est inférieur à 0,6, on fucosyle et/ou on enlève des résidus de galactose audit anticorps avant l'étape c), de manière à ce que le ratio taux de fucose/taux de galactose devienne supérieur à 0,6.

Avantageusement, la dé-galactosylation est effectuée par l'addition d'une galactosidase  
15 dans le milieu contenant l'anticorps.

Avantageusement, l'ajout de résidus de fucose est effectué par l'addition d'une fucosyltransférase dans le milieu contenant l'anticorps.

De manière particulièrement avantageuse, l'anticorps est une immunoglobuline humaine de type IgG. De manière avantageuse, l'anticorps est dirigé contre un CD,  
20 marqueur de différenciation des cellules sanguines humaines ou contre un agent pathogène ou sa toxine listée comme étant particulièrement dangereuse dans les cas de bioterrorisme, notamment *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulium*, *Yersinia pestis*, *Variola major*, *Francisella tularensis*, Filoviruses, Arenaviruses, *Brucella species*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *E.coli*, *Shigella*, *Coxiella burnetii*, la toxine de  
25 ricin, *Rickettsia*, Viral encephalitis viruses, *Vibrio cholerae* ou Hantavirus.

Un autre objet de l'invention se rapporte à un procédé pour diminuer l'activité d'une composition de molécules immunologiquement fonctionnelles, comprenant

l'augmentation du taux de fucose et/ou la diminution du taux de galactose de ladite composition.

Avantageusement, les molécules immunologiquement fonctionnelles sont des anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

- 5 Dans un aspect particulier, l'augmentation du taux de fucose est due à une fucosylation de ladite composition par action d'une fucosyltransférase, préférentiellement d'une  $\alpha$ 1,6-fucosyltransférase.

Dans un autre aspect particulier, la diminution du taux de galactose de ladite composition est due à une dé-galactosylation de la composition par action d'une

- 10 galactosidase, préférentiellement d'une ou plusieurs  $\beta$ -galactosidase.

De manière particulièrement avantageuse, on effectue à la fois une fucosylation et une dé-galactosylation de cette composition.

- Ainsi, un objet de l'invention se rapporte à une composition d'anticorps susceptible  
15 d'être obtenue à partir des procédés selon l'invention décrits ci-dessus, ou une composition d'anticorps obtenue à partir de l'un de ces procédés.

- Un objet supplémentaire de l'invention est l'utilisation de cette composition d'anticorps pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la  
20 prévention des maladies auto-immunes et notamment le PTL, de l'allo-immunisation, des rejets de greffe, des allergies, de l'asthme, des dermatites, des urticaires, des érythèmes, ou des maladies inflammatoires, cette liste n'étant pas exhaustive.

- Enfin, l'invention se rapporte à un procédé pour contrôler l'activité d'une composition  
25 de molécules immunologiquement fonctionnelles, comprenant la régulation du ratio taux de fucose / taux de galactose des oligosaccharides du site de glycosylation de la région Fc des anticorps .

- D'autres aspects et avantages de l'invention seront décrits dans les exemples qui suivent montrant la modulation de « l'effet fucose » par le galactose, qui doivent être  
30 considérés comme illustratifs et ne limitent pas l'étendue de l'invention.

### Description des figures

- 5 **Figure 1** : Structures glycaniques présentes sur le site de glycosylation de la région Fc de différents anticorps anti-Rh(D).

Cette figure représente les pourcentages des différentes formes glycaniques portées par les résidus Asn297 de 3 anticorps anti-Rh(D) : IgG1 anti-D de WinRho (histogrammes noirs), anticorps monoclonal EMAB2 (histogrammes blancs) et Anti-  
10 D1 (histogrammes hachurés).

**Figure 2** : Droite de corrélation entre le rapport taux de fucose / taux de galactose et l'activité ADCC des anticorps anti-Rh(D).

- 15 **Figure 3** : Effet du taux de galactose sur l'activité ADCC des anticorps polyclonaux anti-Rh(D).

Cette figure représente le pourcentage de lyse des hématies Rh(D+) induite par les anticorps polyclonaux anti-Rh(D) dégalactosylés (Dégál.) ou non (Témoin) en présence d'IgG polyvalentes (Tégéline, LFB) à la concentration de 0,5 et 2,5 mg/ml.

20

**Figure 4** : Activation CD16 des anticorps monoclonaux anti-Rh(D) dégalactosylés.

Cette figure représente le % d'activation CD16 induit par la présence des anticorps monocloaux anti-Rh(D) EMAB2 et HH01, dégalactosylés (histogrammes blancs) ou non (Témoin, histogrammes noirs).

25

**Figure 5** : Activation CD16 des anticorps monoclonaux anti-Rh(D) galactosylés.

Cette figure représente l'activation CD16 induite par les anticorps monoclonaux anti-Rh(D), EMAB2 et EMAB3, avant (Témoin, histogrammes noirs) et après galactosylation in vitro par la  $\beta$ 1,4-galactosyltransférase bovine (histogrammes blancs).

30

**Figure 6 :** Courbes de clairance des hématies radiomarquées, sensibilisées ou non par des anticorps anti-Rh(D).

Cette figure représente le suivi de la radioactivité, exprimée en %, contenu dans le sang de volontaires auxquels ont été réinjectées un volume d'hématies radiomarquées au  $\text{Cr}^{51}$  soit non sensibilisées (◆, ◇) soit sensibilisées par la préparation thérapeutique d'anticorps polyclonaux Rhophylac<sup>TM</sup> (●) ou par l'anticorps monoclonal EMAB2 (■, ▲, △). L'anticorps EMAB2 a été testé chez 3 volontaires (008, 009 et 010).

**Figure 7 :** Effet de la dégalactosylation des anticorps monoclonaux anti-HLA DR exprimés dans les lignées cellulaires YB2/0 et CHO-DG44 sur l'activation CD16.

Cette figure représente la quantité, exprimée en pg/ml, d'IL-2 sécrétée par les cellules Jurkat CD16 dont le récepteur CD16 a été activé, en présence de cellules Raji portant sur leur membrane des molécules de HLA DR, par des anticorps chimériques anti-HLA DR, natifs (traits pleins) ou dégalactosylés (traits pointillés).

15

### Exemples

**Exemple 1. Corrélation entre le rapport taux de fucose/taux de galactose et l'activité ADCC d'une cohorte d'anticorps anti- Rh(D).**

20

Nous avons procédé à la mesure du taux de fucose, puis du taux de galactose de divers anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre l'antigène Rhésus (Rh) (D). Nous en avons déduit le rapport entre les deux, et mesuré l'activité ADCC relative à chaque anticorps.

25

#### 1. Production des anticorps monoclonaux anti-Rh(D)

Les anticorps monoclonaux sont issus de la transformation par EBV, de lymphocytes B d'un donneur humain Rh(D) négatif, immunisé avec des hématies portant l'antigène Rh(D). De cette transformation ont été sélectionnés 2 clones:

30

- 1) l'un des clones a été fusionné avec l'hétéromyélome homme/souris K6H6-B5 ;

de cette fusion a été sélectionné le clone HH01.

- 2) à partir de l'autre clone, ont été extraits les ARN codant l'anticorps anti-Rh(D) pour la préparation d'un vecteur d'expression de la chaîne lourde et de la chaîne légère de l'anticorps.

- 5 Ce vecteur d'expression a été utilisé pour transfecter, d'une part la lignée cellulaire YB2/0 donnant naissance aux anticorps EMAB1, EMAB2, EMAB3 et EMAB4 et, d'autre part, les lignées CHO suivantes : DG44, K1 et Lec13 qui synthétisent les anticorps Anti-D1, Anti-D2 et Anti-D3, respectivement.

## 10 2. Purification des anticorps polyclonaux.

- Les anticorps polyclonaux anti-Rh(D) ont été immunopurifiés à partir d'un produit thérapeutique, WinRho (Cangène), par sélection positive sur hématies Rh(D+) puis par sélection négative sur hématies RhD(-) ; enfin, une étape de chromatographie d'affinité utilisant le gel de Sépharose-protéine A a permis d'une part d'éliminer les
- 15 contaminants récupérés au cours de l'immunopurification sur hématies et, d'autre part, de séparer les IgG1 des IgG3, étant donné que seules les IgG1 ont été utilisées dans les essais suivants.

## 3. Analyse des glycannes par HPCE-LIF

- 20 Les anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-Rh(D) sont déssalés sur une colonne de Sephadex G-25 (HiTrap Desalting, Amersham Biosciences), séchés par évaporation et remis en suspension dans le tampon d'hydrolyse de la PNGase F (Glyko) en présence de 50 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol. Après 16 h d'incubation à 37°C, la partie protéique est précipitée par l'ajout d'éthanol absolu et le surnageant, qui contient les
- 25 N-glycannes, est séché par évaporation. Les oligosaccharides ainsi obtenus sont soit marqués directement par un fluorochrome, l'APTS (1-amino-pyrène-3,6,8-trisulfonate) soit soumis à l'action d'exoglycosidases spécifiques avant marquage par l'APTS. Puis les oligosaccharides marqués sont injectés sur un capillaire *N*-CHO et séparés et

quantifiés par électrophorèse capillaire à détection de fluorescence induite par laser (HPCE-LIF).

L'évaluation du taux de fucose est réalisée soit par l'addition des formes fucosylées isolées, soit plus spécifiquement après action simultanée de la neuraminidase, la  $\beta$ -galactosidase et la *N*-acétylhexosaminidase, permettant d'obtenir, sur l'électrophorégramme, 2 pics correspondant au pentasaccharide [GlcNac2-Man3] fucosylé ou non.

10 Le taux de fucose, exprimé en %, est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Taux de fucose} = \frac{[\text{GlcNac2-Man3}] \text{ fucosylé} \times 100}{[\text{GlcNac2-Man3} + \text{GlcNac2-Man3 fucosylé}]}$$

Le taux de galactose, exprimé en %, est calculé en additionnant les pourcentages des formes oligosaccharidiques contenant du galactose en position terminale. La formule utilisée est la suivante :

15      Taux de galactose =  $[(G1+G1B+G1F+G1FB) + 2x(G2+G2F+G2B+G2FB)]$

Le rapport taux de fucose/taux de galactose est obtenu en divisant le taux de fucose par le taux de galactose, les taux étant calculés comme décrit ci-dessus.

#### 4. Activité fonctionnelle des anticorps : ADCC

20 La technique ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) permet d'évaluer la capacité des anticorps à induire la lyse des hématies Rh(D+), en présence de cellules effectrices (cellules mononuclées ou lymphocytes).

Brièvement, les hématies d'un concentré globulaire RhD(+) sont traitées à la papaïne (1mg/ml, 10 min à 37°C) puis lavées en NaCl 0,9%. Les cellules effectrices sont isolées à partir d'un pool d'au moins 3 buffy-coat, par centrifugation sur Ficoll (Amersham), suivi d'une étape d'adhérence en présence de 25% de SVF, de façon à

25

obtenir un ratio lymphocytes/monocytes de l'ordre de 9. Dans une plaque de microtitration (96 puits) on dépose par puits : 100 µl d'une dilution d'anticorps anti-Rh(D) purifié (de 9,3 à 150 ng/ml), 25 µl d'hématies papainées Rh(D+) (soit  $1.10^6$ ), 25 µl de cellules effectrices (soit  $2.10^6$ ) et 50 µl d'IgG polyvalentes (Tégéline, LFB) aux concentrations usuelles de 2 et 10 mg/ml. Les dilutions sont faites en IMDM 0,25% de sérum de veau fétal (SVF). Après une nuit d'incubation 1 nuit à 37°C, les plaques sont centrifugées, puis l'hémoglobine libérée dans le surnageant est mesurée par l'intermédiaire de son activité peroxydasique en présence d'un substrat chromogénique, le 2,7-diaminofluorène (DAF). Les résultats sont exprimés en pourcentage de lyse, 100% correspondant à la lyse totale des hématies en  $NH_4Cl$  (témoin 100%) et 0% au mélange réactionnel sans anticorps (témoin 0%). La lyse spécifique est calculée en pourcentage selon la formule suivante :

$$\frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO témoin 0\%}) \times 100}{\text{DO témoin 100\%} - \text{DO témoin 0\%}} = \% \text{ ADCC}$$

15

L'analyse, par HPCE-LIF, des oligosaccharides portés par le site de glycosylation de la région Fc des IgG1 anti-Rh(D) a été réalisée.

TABLEAU I

Nom Anticorps	Taux de Fucose (%)	Taux de Galactose (%)	Ratio Fucose/ Galactose	ADCC (%)
EMAB1	42,3	75,3	0,56	85
EMAB2	25,6	72,9	0,35	100
EMAB3	82,1	56,1	1,46	25
EMAB4	40	60,6	0,66	73
HH01	38,1	79,3	0,48	89
Anti-D WinRho*	76,1	120	0,63	70
Anti-D1	100	88,8	1,13	0
Anti-D2	95,7	71,8	1,33	0
Anti-D3	24,3	58,4	0,42	70

\* Anti-D polyclonaux immunopurifiés



Les valeurs des ratios [taux de fucose/taux de galactose] et des pourcentages d'ADCC, contenus dans le tableau I, sont reportées respectivement en abscisse et en ordonnée de la Fig.2. Le coefficient de corrélation de la droite de régression linéaire tracée est égal à 0,92.

- 5 Ainsi, il existe une corrélation entre le ratio [taux de fucose / taux de galactose] et l'activité ADCC des anticorps anti-Rh(D) monoclonaux et polyclonaux. Les anticorps qui ont une activité ADCC importante présentent un ratio taux de fucose / taux de galactose inférieur à 0,6.

10 **EXEMPLE 2. Comparaison de l'activité ADCC des anticorps polyclonaux anti-Rh(D) avant et après dégalactosylation**

1. Dégalactosylation des anticorps polyclonaux anti-Rh(D).

- Les anticorps polyclonaux immunopurifiés sont dialysés contre le tampon d'hydrolyse (Acétate de sodium 50 mM, pH 5,5 contenant 4 mM chlorure de calcium). Les anticorps sont désialylés et dégalactosylés par incubation en présence de 5 mU de neuraminidase (EC 3.2.1.18) de *Vibrio cholerae* (Calbiochem) et 9 mU de  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) produite par *E.coli* (Roche). Le contrôle, désigné sous le nom de « témoin », est constitué de la même préparation d'anticorps traité comme
- 15 indiqué ci-dessus mais en absence de neuraminidase et de  $\beta$ -galactosidase. Après 24h d'incubation à 37 °C, les anticorps sont stockés à 4°C.

Les anticorps générés dans cet exemple sont séparés en deux fractions ; l'une des fractions est utilisée pour l'analyse glycannique et l'autre fraction est réservée à la mesure de l'activité ADCC.

25

2. Analyse des glycannes par HPCE-LIF

- La procédure consiste en un dessalage sur colonne de Sephadex-G25 de la fraction d'anticorps polyclonaux anti-Rh(D) dégalactosylés afin d'éliminer les sels mais aussi les oses libres qui pourraient être présents dans la préparation. Après dénaturation et
- 30 réduction des anticorps, les glycannes sont libérés par action de l'endoglycosidase

PNGase F (Glyko) . Après 16 h d'incubation à 37°C, la partie protéique est précipitée par l'ajout d'éthanol absolu et le surnageant, qui contient les *N*-glycannes, est séché par évaporation. Pour évaluer les taux de galactose et de fucose contenus dans les oligosaccharides ainsi obtenus, l'échantillon est soumis à l'action simultanée de sialidase et de fucosidase ou de sialidase,  $\beta$ -galactosidase et *N*-acétylhexosaminidase, respectivement, avant marquage par l'APTS. Puis les oligosaccharides marqués sont injectés sur un capillaire *N*-CHO et séparés et quantifiés par électrophorèse capillaire à détection de fluorescence induite par laser (HPCE-LIF).

### 3. Mesure de l'activité ADCC.

La mesure de l'activité ADCC des anticorps polyclonaux avant et après traitement par la  $\beta$ -galactosidase est réalisée selon la méthode décrite dans l'exemple 1.

Ainsi, après action de la  $\beta$ -galactosidase, les glycannes de la région Fc des anticorps polyclonaux anti-Rh(D) présentent un taux de galactose résiduel de 17,7 % et un taux de fucose égal à 68,5%. Le ratio taux de fucose / taux de galactose des anticorps polyclonaux dégalactosylés est donc égal à 3,8.

La présence, dans le test ADCC, d'IgG polyvalentes comme Tégéline dans l'exemple présent, bloque les récepteurs de haute affinité (c'est-à-dire Fc $\gamma$ RI ou CD64), rendant ainsi la lyse des hématies Rh(D+) plus spécifique de l'interaction des anticorps anti-Rh(D) avec les récepteurs Fc $\gamma$ RIII présents sur les cellules effectrices.

Les résultats présentés Fig. 3 montrent d'une part que l'activité ADCC des anticorps polyclonaux anti-Rh(D) est dose dépendante et d'autre part, que l'augmentation de la quantité d'IgG polyvalentes dans le mélange réactionnel provoque une diminution de l'activité lytique des anticorps polyclonaux. De plus, les anticorps polyclonaux dégalactosylés ont une activité ADCC diminuée par rapport aux anticorps témoins.

TABLEAU II.

Anticorps polyclonaux dégalactosylés (ng/ml)	Activité ADCC (%)	
	Tégéline 0,5 mg/ml	Tégéline 2,5mg/ml
75	72	42
37,5	65	46
18,75	47	40
9,4	23	0

Le pourcentage d'activité ADCC des anticorps polyclonaux anti-Rh(D) dégalactosylés par rapport aux anticorps témoins, c'est-à-dire ayant subi la même incubation mais en absence de neuraminidase et de  $\beta$ -galactosidase, sont présentés dans le tableau II.

Ainsi, la diminution de l'activité ADCC des anticorps polyclonaux dégalactosylés par rapport aux anticorps témoins est d'autant plus importante que la quantité d'anticorps est faible. De plus, la diminution d'activité des anticorps polyclonaux dégalactosylés est plus importante en présence d'une concentration d'IgG polyvalentes de 2,5 mg/ml.

### Exemple 3. Mesure de l'activation du récepteur CD16 induite par les anticorps monoclonaux anti-Rh(D) dégalactosylés

1. Dégalactosylation des anticorps monoclonaux anti-Rh(D)

Les anticorps sont dialysés contre le tampon d'hydrolyse (Acétate de sodium 50 mM, pH 5.5 contenant 4 mM chlorure de calcium). Les anticorps sont désialylés et dégalactosylés par une incubation en présence de 5 mU de neuraminidase (EC 3.2.1.18) de *Vibrio cholerae* (Calbiochem) et 9 mU de  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) produite par *E.coli* (Roche). Le contrôle, désigné sous le nom de « témoin », est constitué de la même préparation d'anticorps traitée comme indiqué ci-dessus mais en absence de neuraminidase et de  $\beta$ -galactosidase. Après 24h d'incubation à 37°C, les anticorps sont stockés à 4°C.

Les anticorps générés dans cet exemple sont séparés en deux fractions ; l'une des fractions est utilisée pour l'analyse glycanique et l'autre fraction est réservée à la mesure de l'activité fonctionnelle.

## 5 2. Mesure de l'activation du récepteur CD16

Le test d'activation des cellules Jurkat CD16 mesure la sécrétion de l'interleukine-2 (IL-2) induite par la fixation du Fc des anticorps sur le CD16 (FcγRIIIA) après liaison du Fab à son antigène, présent sur la cellule cible. Le taux d'IL-2 sécrété par les cellules Jurkat CD16 est proportionnel à l'activation du récepteur CD16.

- 10 Dans une plaque de microtitration de 96 puits, on dépose successivement 50 µl de dilutions d'anticorps, 50 µl d'une suspension d'hématies à  $6.10^5$ /ml, 50 µl d'une suspension de cellules Jurkat CD16 à  $1.10^6$ /ml et 50 µl d'une solution de PMA à 40 ng/ml. Toutes les dilutions ont été réalisées en milieu de culture IMDM contenant 5% SVF.
- 15 Après 16 heures d'incubation à 37°C et 7% de CO<sub>2</sub>, la plaque de microtitration est centrifugée et la quantité d'IL-2 contenue dans le surnageant est dosée par un kit commercial (Duoset, R&D). Les taux d'IL-2 sécrétée sont exprimés en pg/ml. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activation CD16, le taux d'IL-2 sécrétée en présence de l'anticorps monoclonal témoin étant considéré égal à 100%.
- 20

Les résultats d'analyse des glycanes réalisée par HPCE-LIF comme décrit dans l'exemple 2, sont réunis dans le tableau III.

TABLEAU III

Anticorps Glycanes	EMAB2		HH01	
	Témoin	Dégalactosylé	Témoin	Dégalactosylé
Fucose (%)	25,6	26,8	38,1	41,9
Galactose (%)	72,9	0	79,3	17,3
Ratio Fuc/Gal	0,35	N.A.	0,48	2,42

Ainsi, il apparaît que l'anticorps monoclonal EMAB2 est totalement dégalactosylé alors que l'anticorps HH01 contient encore 17,3 % de formes monogalactosylées. Après action de la  $\beta$ -galactosidase, le ratio taux de fucose / taux de galactose des anticorps EMAB2 et HH01 devient donc très supérieur à 0,6.

Les anticorps monoclonaux anti-Rh(D) dégalactosylés présentent une activation CD16 très diminuée par rapport aux anticorps témoins (Fig. 4). Ainsi les anticorps monoclonaux EMAB2 et HH01 présentent une diminution de leur capacité à induire l'activation du CD16 de 52 et 47 %, respectivement.

#### **Exemple 4. Mesure de l'activation CD16 induite par des anticorps monoclonaux anti-Rh(D) galactosylés**

##### **1. Galactosylation des anticorps.**

Les anticorps sont dialysés contre du tampon HEPES 50 mM, pH 7.20. Le mélange réactionnel est constitué de la solution d'anticorps monoclonal à laquelle sont ajoutés 10 mM  $MnCl_2$ , 20 mM UDP-galactose et 40 mU de  $\beta$ 1,4-galactosyltransférase bovine (Calbiochem). Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes sont conservés à 4°C avant utilisation.

Le contrôle est constitué du même anticorps incubé dans les mêmes conditions excepté l'absence d' UDP-Gal dans le milieu réactionnel.

Les anticorps générés dans cet exemple sont séparés en deux fractions ; l'une des fractions est utilisée pour l'analyse glycanique et l'autre fraction est réservée à la mesure de l'activité ADCC.

##### **2. Dosage du galactose par ELISA lectine**

De part leur spécificité de reconnaissance, les lectines ont été utilisées dans de nombreuses applications de biologie et de médecine et notamment dans l'analyse des

glycannes par technique ELISA. La lectine RCA1, qui reconnaît le galactose lié en  $\beta$ 1,4, a été utilisée pour doser le galactose présent dans les N-glycannes des anticorps.

5 Les anticorps monoclonaux sont immobilisés dans les puits d'une plaque de microtitration. Après 20 minutes de chauffage à 100°C pour dénaturer les molécules d'IgG afin de rendre les N-glycannes de la région Fc accessibles, les puits sont incubés 2 h. à température ambiante et sous agitation douce en présence d'une solution de RCA<sub>1</sub> biotinylée (Vector). Après lavage pour éliminer la lectine n'ayant pas réagi, la streptavidine-peroxidase est ajoutée dans chaque puits, incubée 1 h et la lectine fixée  
10 est mesurée à 492 nm après addition d'O-phénylènediamine. Parallèlement, la quantité d'anticorps fixée dans les puits de la plaque de microtitration est mesurée par un anticorps anti-IgG humaine marquée à la peroxidase. Puis la quantité de lectine fixée est corrigée par la quantité d'anticorps fixé dans les puits de microtitration.

15

### 3. Mesure de l'activation du récepteur CD16

Les conditions opératoires utilisées pour mesurer l'activation du récepteur CD16 des anticorps monoclonaux galactosylés sont identiques à celles décrites ci-dessus.

20 Les anticorps monoclonaux décrits dans l'exemple présent sont des anticorps anti-Rh(D) ayant la même séquence primaire et produits par la cellule YB2/0. Ils diffèrent par leur activité fonctionnelle, en liaison avec leur taux de fucosylation en  $\alpha$ 1,6 qui est de 25% pour EMAB2 et 53% pour EMAB3.

Après action *in vitro* de la  $\beta$ -1,4-galactosyltransférase, l'activation CD16 induite par  
25 les anticorps monoclonaux EMAB2 et EMAB3 est augmentée de 10 et 54%, respectivement (Fig. 5). Ainsi, l'augmentation de la galactosylation de l'anticorps EMAB2, qui à l'origine possède une très bonne activité effectrice, n'induit qu'une très faible amélioration de l'activation CD16 tandis que l'augmentation de la

galactosylation de l'anticorps EMAB3, fortement fucosylé, se traduit par une amélioration très significative de l'activité CD16.

5 **EXEMPLE 5 : Etude de la clairance des hématies sensibilisées par l'anticorps monoclonal anti-Rh(D) EMAB2.**

L'anticorps monoclonal anti-Rh(D) EMAB2 a été évalué dans un essai clinique de phase I afin de comparer la clairance des hématies sensibilisées par cet anticorps avec  
10 celle des hématies sensibilisées par Rhophylac™, préparation thérapeutique d'anticorps polyclonaux anti-Rh(D) utilisée en clinique.

Les hématies de volontaires sains sont marquées *ex-vivo* au chrome 51 (<sup>51</sup>Cr) et sensibilisées, c'est-à-dire incubées, en présence d'anticorps anti-Rh(D), EMAB2 ou Rhophylac™, pour obtenir un niveau de saturation de 25% des sites antigéniques avant  
15 d'être ré-injectées aux volontaires.

La disparition dans la circulation sanguine des hématies marquées au <sup>51</sup>Cr a été suivie par mesure de la radioactivité au compteur gamma sur des prélèvements sanguins réalisés à 3, 15, 30 minutes et 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96 heures après la transfusion des hématies marquées et sensibilisées. L'échantillon de sang prélevé à 3 minutes après  
20 la transfusion des hématies représente le 100% de survie des globules rouges.

Les résultats présentés à la figure 6 montrent qu'en absence de sensibilisation des hématies radiomarquées par un anticorps, la diminution de la radioactivité mesurée sur une période supérieure à 100 h, est inférieure à 20%. Par contre, lorsque les hématies  
25 sont sensibilisées par une préparation thérapeutique d'anticorps polyclonaux ou par l'anticorps monoclonal EMAB2, la radioactivité sanguine décroît rapidement ; dix heures après l'injection, il reste moins de 10% de la radioactivité injectée. Ainsi, la courbe de disparition des hématies sensibilisées par l'anticorps monoclonal EMAB2 a

un profil similaire à celle des hématies *sensibilisées* par la préparation thérapeutique d'anticorps polyclonaux Rhophylac™.

L'anticorps monoclonal EMAB2 dont le rapport taux de fucose / taux de galactose est égal à 0,4, possède une activité *in vivo*, vis à vis de la clairance des hématies Rh(D+) *pré-sensibilisées*, au moins comparable à celle d'une préparation d' anticorps polyclonaux thérapeutique.

Des études cliniques réalisées dans les mêmes conditions mais avec un autre anticorps monoclonal, appelé MonoD, avaient donné des résultats très différents ; à 25% de saturation des site antigéniques membranaire, la clairance induite par MonoD n'était que partielle. L'analyse glycanique de l'anticorps MonoD avait révélé la présence d'un taux de fucose de 80% et de galactose de 86%, soit un ratio égal à 0,93.

La comparaison de ces résultats cliniques montre donc que les anticorps monoclonaux anti-D, ayant un ratio taux de fucose / taux de galactose inférieur ou égal 0,6, présentent une efficacité sur la clairance des hématies supérieure à celle des anticorps dont le ratio est proche de 1.

#### **Exemple 6 : Modification du taux de galactose d'un anticorps monoclonal anti-HLA DR exprimé par les lignées cellulaires CHO et YB2/0**

20

##### **1. Production de l'anticorps monoclonal anti-HLA DR**

##### **1.1. Construction des vecteurs d'expression**

L'anticorps anti-HLA DR utilisé dans cette étude provient de la chimérisation de l'anticorps de souris, d'isotype IgG2a, exprimé par l'hybridome Lym-1 (ATCC Hb-8612).

25

L'ARN extrait de l'hybridome producteur de l'anticorps murin a été converti en cDNA. La région VK murine a été amplifiée à l'aide des amorces K-Lym-Not1 et K-Lym-Dra3 puis clonée dans le vecteur de chimérisation CK-Hu, préalablement digéré



par Not1 et Dra3, qui contient la séquence CK d'un anticorps anti-D humain et le gène de sélection DHFR.

La région VH murine a été amplifiée à l'aide des amorces H-Lym-Not 1 et H-Lym-Apa 1 puis clonée dans le vecteur de chimérisation G1-Hu, préalablement digéré par Not 1 et Apa 1, qui contient la séquence G1 d'un anticorps anti-D humain et le gène de sélection NEO.

Le promoteur hEF-1a et la région 5'UTR du gène hEF-1a, contenant l'exon 1 non codant et le premier intron, a été isolé à partir du plasmide commercial pEF/Bsd (Invitrogen) par double digestion Nhe I et Acc 65 I. Parallèlement, le promoteur RSV, présent dans les vecteurs d'expression décrits ci-dessus, a été délété par double digestion Bgl II et Spe I puis remplacé par le fragment Nhe I- Acc65 I.

#### 1.2. Obtention de lignées productrices stables

Les vecteurs d'expression pEF-Lym-dhfr-K-10 et pEF-Lym-neo-H-12 codant, respectivement, pour la chaîne légère et la chaîne lourde de l'anticorps chimérique anti-HLA DR, ont été utilisés pour co-transfecter, par électroportation, les lignées CHO-DXB11 (ATCC n°CRL-11397) et YB2/0 (ATCC n°CRL-1662).

Après transfection, les cellules en culture ont été soumises à une double pression de sélection comprenant d'une part, la délétion en nucléosides du milieu de culture et d'autre part l'addition de G418. Les transformants résistant à cette double pression de sélection ont ensuite été clonés par dilution limite.

Les 2 clones sélectionnés sont YB2/0-DR-4B7 pour la lignée cellulaire d'expression YB2/0 et DXB11-DR-22A10 pour la lignée cellulaire d'expression CHO-DXB11.

25

#### 1.3. Production et purification de l'anticorps chimérique anti-HLA DR

Le clone YB2/0-DR-4B7 a été cultivé dans un cytotecteur de 10 litres (BiolaFitte) en milieu EM-SF1.1, milieu de base EMS supplémenté par Insuline (1 µg/ml), Citrate de fer (50 µg/ml), HEPES (4 mg/ml) et Pluronic F68 (0,5 mg/ml).

30

Le clone DXB11-DR-22A10 a été cultivé en cytotuteur de 10 litres (BiolaFitte) en milieu CHO SFM4 utility (Perbio) supplémenté par 2% d'hypoxanthine.

Lorsque la viabilité cellulaire est inférieure à 50 %, les milieux de culture sont collectés, centrifugés pour éliminer les cellules et les anticorps chimériques contenus dans les surnageants sont purifiés par chromatographie d'affinité sur Sépharose-protéine A.

## 2. Dégalactosylation

Les anticorps chimériques anti-HLA DR ont été dialysés contre un tampon Acétate de sodium 50 mM, pH 5,50 contenant 4 mM CaCl<sub>2</sub>. Les anticorps sont dégalactosylés par incubation en présence de 5 mU de neuraminidase (EC 3.2.1.18) de *Vibrio cholerae* (Calbiochem) et 9 mU de  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) produite par *E. coli* (Roche). Le contrôle est constitué du même anticorps traité comme indiqué ci-dessus mais en absence de neuraminidase et de  $\beta$ -galactosidase. Après 24h d'incubation à 37°C, les anticorps sont stockés à 4°C.

Les anticorps générés dans cet exemple sont séparés en deux fractions ; l'une des fractions est utilisée pour l'analyse glycanique et l'autre fraction est réservée à la mesure de l'activité fonctionnelle.

## 3. Mesure de l'activation CD16

La lignée cellulaire Raji est utilisée comme cible car elle porte à sa surface le déterminant antigénique du complexe majeur d'histocompatibilité HLA-DR. Dans une plaque de microtitration de 96 puits, sont déposés successivement 50  $\mu$ l de dilutions d'anticorps, 50  $\mu$ l d'une suspension de cellules Raji à  $6.10^5$ /ml, 50  $\mu$ l d'une suspension de cellules Jurkat CD16 à  $1.10^6$ /ml et 50  $\mu$ l d'une solution de PMA à 40 ng/ml. Toutes les dilutions ont été réalisées en milieu de culture EMS contenant 5% SVF.

Après 16 heures d'incubation à 37°C et 7% de CO<sub>2</sub>, la plaque de microtitration est centrifugée et la quantité d'IL-2 contenue dans le surnageant est dosée par un kit commercial (Duoset, R&D). Les taux d'IL-2 sécrétée sont exprimés en pg/ml.

Les résultats sont exprimés en % d'activation CD16, le taux d'IL-2 sécrétée en présence de l'anticorps monoclonal témoin étant considéré égal à 100%.

Les anticorps chimériques anti-HLA DR ont des structures glycaniques très différentes selon qu'ils sont exprimés par la lignée YB2/0 ou CHO DXB11. Ainsi, le ratio taux de fucose / taux de galactose de l'anticorps exprimé par YB2/0 est égal à 0,37 alors que le ratio de l'anticorps exprimé dans CHO est très augmenté, puisqu'il est égal à 1,3.

L'activation CD16 des anticorps natifs est en accord avec les valeurs des ratio taux de fucose / taux de galactose ; ainsi, la sécrétion d'IL-2 induite par l'anticorps anti-HLA DR synthétisé par YB2/0 et qui a un ratio de 0,37 est 2 fois plus importante que celle induite par le même anticorps synthétisé par CHO DXB11 mais dont le ratio est égal à 1,3.

Après action de la  $\beta$ -galactosidase, le taux de galactose restant sur les *N*-Glycannes de la région Fc a été déterminé par HPCE-LIF. La dégalactosylation est presque totale, les taux de formes G1 pour l'anticorps produit par CHO et G1B pour l'anticorps produit par YB2/0, étant respectivement de 7% et 4,4%. Cette baisse du taux de galactose se traduit par une diminution significative de l'activation CD16 par rapport aux anticorps témoin, comme présenté Figure 7.

### Références

- Boyd PN, Lines AC, Patel AK. The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. (1995) *Mol. Immunol.* **32**, 1311-1318.
- 5
- Davies J, Jiang L, Pan LY, Labarre MJ, Anderson D, Reff M. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. (2001)
- 10 *Biotechnol. Bioeng.* **74**, 288-294.
- Furukawa K, Kobata A. IgG galactosylation – its biological significance and pathology. (1991) *Mol. Immunol.* **28**, 1333-1340.
- 15 Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. (1975) *Nature* **256**, 495-7.
- Kumpel BM, Rademacher TW, Rook GA, Williams PJ, Wilson IB. Galactosylation of human IgG monoclonal anti-D produced by EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines is dependent on culture method and affects Fc receptor-mediated functional activity. (1994)
- 20 *Hum. Antibodies Hybridomas* **5**, 143-151.
- Nose M, Wigzell H. Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6632-6636.
- 25
- Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weiler SHA, Presta LG. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 26733-26740.
- 30 Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K. Absence of fucose but not presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides

shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. (2003) *J Biol Chem.* **278**, 3466-3473.

5 Tao MH, Morrison SL. Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. (1989) *J. Immunol.* **143**, 2595-2601.

10 Tsuchiya N, Endo T, Matsuta K, Yoshinoya S, Aikawa T, Kosuge E, Takeuchi F, Miyamoto T, Kobata A. Effects of galactose depletion from oligosaccharide chains on immunological activities of human IgG. (1989) *J. Rheumatol.* **16**, 285-290.

Umana P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. (1999) *Nat. Biotechnol.* **17**, 176-180.

15 Wright A, Morrison SL. Effect of C2-associated carbohydrate structure on Ig effector function : Studies with chimeric mouse-human IgG1 antibodies in glycosylation mutants of chinese hamster ovary cells 1. (1998) *J.Immunol.* **160**, 3393-3402.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain  
5 ayant une forte activité effectrice, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) production et purification d'anticorps monoclonaux obtenus à partir de différentes sources, notamment de cellules, plantes ou animaux non humains, éventuellement génétiquement modifiés ou transformés,
  - 10 b) mesure du taux de fucose et du taux de galactose des structures glycaniques portées par le site de glycosylation de la région Fc desdits anticorps,
  - c) sélection des anticorps dont le ratio taux de fucose / taux de galactose est inférieur ou égal à 0,6, préférentiellement inférieur à 0,5 ou à 0,4.
- 15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdits anticorps sont produits dans des cellules modifiées génétiquement par introduction d'au moins un vecteur permettant l'expression desdits anticorps, lesdites cellules étant des cellules eucaryotes ou procaryotes, notamment des cellules de mammifères, d'insectes, de plantes, de bactéries ou de levures.
- 20 3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdites cellules sont modifiées génétiquement par introduction d'au moins un vecteur permettant l'expression d'au moins un polypeptide possédant une activité glycosyltransférase.
- 25 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ladite activité glycosyltransférase est une activité galactosyltransférase.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite activité galactosyltransférasique est une activité de beta(1,4)-galactosyltransférase ou une activité de beta(1,3)-galactosyltransférase.
- 5 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdites cellules possèdent une activité relative à la synthèse, et/ou au transport du GDP-fucose et/ou à l'activité d'une enzyme impliquée dans l'addition de fucose à l'oligosaccharide du site de glycosylation des anticorps diminuée ou déletée.
- 10 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'enzyme impliquée dans la synthèse du GDP-fucose est la GMD (GDP-D-mannose 4,6-déhydratase), la Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-épimérase, 4-réductase) ou la GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase).
- 15 8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ladite enzyme impliquée dans l'addition du fucose est une fucosyltransférase.
- 20 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que si à l'étape b), le ratio mesuré est supérieur à 0,6, on dé-fucosyle et/ou on ajoute des résidus de galactose audit anticorps avant l'étape c).
10. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que ladite dé-fucosylation est effectuée par l'addition d'une fucosidase dans le milieu contenant l'anticorps.
- 25 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que l'ajout de résidus de galactose est effectué par l'addition d'une galactosyltransférase dans le milieu contenant l'anticorps.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdites cellules proviennent de lignées cellulaires animales ou humaines, lesdites lignées étant sélectionnées notamment parmi les lignées de myélomes de rat, notamment YB2/0 et IR983F, de myélome humain comme Namalwa ou toute autre cellule d'origine humaine comme PERC6, les lignées CHO, notamment CHO-K, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO Pro-5, CHO dhfr-, CHO Lec13, ou d'autres lignées choisies parmi Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8.653.
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit anticorps est une immunoglobuline humaine de type IgG.
14. Procédé de préparation selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'anticorps est un anti-facteur Rhésus (anti-D), anti-CD, anti-tumeurs, anti-virus, anti-CD20 ou un anti-HLA-DR.
15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite activité effectrice est une activité fonctionnelle de type ADCC.
16. Procédé pour augmenter l'activité effectrice d'une composition de molécules immunologiquement fonctionnelles, comprenant l'augmentation du taux de galactose et/ou la diminution du taux de fucose de la composition de molécules.
17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que lesdites molécules immunologiquement fonctionnelles sont des anticorps monoclonaux ou polyclonaux.
18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 16 ou 17, caractérisé en ce que lesdites molécules possèdent à l'état natif un fort taux de fucose.



19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisé en ce que la diminution du taux de fucose est due à une dé-fucosylation de ladite composition par action d'une fucosidase, notamment une  $\alpha$ 1,6 fucosidase.

- 5 20. Procédé selon les revendications 16 à 19, caractérisé en ce que l'augmentation du taux de galactose de ladite composition est due à une galactosylation de la composition par action d'une galactosyltransférase.

- 10 21. Cellule dérivée de la lignée cellulaire YB2/0 dans laquelle au moins un vecteur codant pour une molécule d'anticorps est introduite, ladite cellule produisant un anticorps dont le ratio taux de fucose/taux de galactose des oligosaccharides du site de glycosylation de la région Fc des anticorps est inférieur ou égal à 0,6.

- 15 22. Cellule selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle est transfectée par un vecteur d'expression codant pour une galactosyltransférase.

- 20 23. Cellule selon l'une quelconque des revendications 21 ou 22, caractérisée en ce que ladite galactosyltransférase est une beta(1,4)-galactosyltransférase ou une beta(1,3)-galactosyltransférase.

24. Cellule selon l'une quelconque des revendications 21 à 23, caractérisée en ce que ladite cellule sur-exprime ladite galactosyltransférase.

- 25 25. Cellule selon l'une quelconque des revendications 21 à 24, caractérisée en ce que ladite galactosyltransférase est codée par une séquence ayant pour origine l'homme, la souris, le hamster, la vache, le mouton, la chèvre, le cochon, le cheval, le rat, le singe, le lapin ou le poulet.

26. Cellule selon la revendication 25, caractérisée en ce que ladite séquence est la séquence NM 001497, AB 024434, NM 003780, BC 053006, XM 242992 ou NM 177512.

- 5 27. Procédé de préparation d'anticorps dont les structures glycaniques portées par le site de glycosylation de la région Fc possèdent un ratio taux de fucose/taux de galactose inférieur ou égal à 0,6, préférentiellement inférieur à 0,5 ou encore à 0,4 comprenant la culture d'une cellule selon l'une de revendications 21 à 26 dans un milieu de culture et à des conditions permettant l'expression desdits vecteurs.

10

28. Anticorps thérapeutiques ayant une forte activité effectrice, susceptible d'être obtenue à partir du procédé selon l'une des revendications 1 à 20 et 27, lesdits anticorps étant caractérisés en ce qu'ils présentent sur leur site de glycosylation de la région Fc, des structures glycaniques possédant un ratio taux de fucose / taux de

15

galactose inférieur à 0,6, préférentiellement inférieur à 0,5 ou encore à 0,4.

29. Composition pharmaceutique comprenant un anticorps selon la revendication 28 et au moins un excipient.

20

30. Composition pharmaceutique comprenant au moins 50%, préférentiellement 60%, 70%, 80% ou encore 90% ou 99% d'un anticorps monoclonal dont les structures glycaniques portées par le site de glycosylation de la région Fc possèdent un ratio taux de fucose / taux de galactose inférieur à 0,6 préférentiellement inférieur à 0,5 ou encore à 0,4 .

25

31. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 29 ou 30 dans laquelle l'anticorps est dirigé contre un antigène normal non ubiquitaire, notamment un facteur Rhésus, comme le facteur Rhésus (D) du globule rouge humain, ou un antigène d'une cellule pathologique ou d'un organisme pathogène pour l'homme, en particulier contre un antigène d'une cellule cancéreuse.

30

32. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 29 à 31, caractérisée en ce que lesdits anticorps sont des IgG.

5 33. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 28 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de l'allo-immunisation, notamment la maladie hémolytique du nouveau-né.

10 34. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 28 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies auto-immunes, des cancers et des infections par des agents pathogènes, notamment pour le traitement des maladies choisies parmi le Syndrome de Sézary, les cancers solides, notamment dont les cibles antigéniques sont faiblement exprimées, notamment le cancer du sein, les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux biphényles  
15 polychlorinés, les maladies infectieuses, notamment la tuberculose, le syndrome de la fatigue chronique (CFS), les infections parasitaires comme par exemple les schistosomules, et les infections virales.

20 35. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 28 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers des cellules HLA classe II positives, les leucémies lymphoïdes aiguës des cellules B et T, les leucémies myéloïdes chroniques et aiguës, le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, les leucémies myéloïde, les lymphomes des cellules T, et les lymphomes non hodgkinien.

25 36. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 33 à 35 caractérisée en ce que l'anticorps est un anti-HLA-DR ou un anti-CD20.

37. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 28 pour la fabrication d'un médicament destiné à induire l'expression de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6,

IL-12, IL-18, IL-21, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IFN $\gamma$ , et IP10 par les cellules effectrices naturelles du système immunitaire, ledit médicament étant utile notamment pour le traitement du cancer et des infections virales, bactériennes ou parasitaires.

- 5 38. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 28 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de patients présentant un des polymorphismes du CD16, en particulier V/F158 ou F/F158, notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

10

39. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain ayant une faible activité effectrice, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 15 a) production et purification d'anticorps monoclonaux obtenus à partir de différentes sources, notamment de cellules, plantes ou animaux non humains, éventuellement génétiquement modifiés ou transformés,
- b) mesure du taux de fucose et du taux de galactose des structures glycaniques portées par le site de glycosylation de la région Fc desdits anticorps,
- 20 c) sélection des anticorps dont le ratio taux de fucose / taux de galactose est supérieur à 0,6.

40. Procédé selon la revendication 39, caractérisé en ce que lesdits anticorps sont produits dans des cellules modifiées génétiquement par introduction d'au moins un vecteur permettant l'expression desdits anticorps, lesdites cellules étant des cellules

25 eucaryotes ou procaryotes, notamment des cellules de mammifères, d'insectes, de plantes, de bactéries ou de levures.

41. Procédé selon l'une quelconque des revendications 39 ou 40, caractérisé en ce que lesdites cellules sont modifiées génétiquement par introduction d'au moins un vecteur

permettant l'expression d'au moins un polypeptide possédant une activité glycosyltransférasique.

42. Procédé selon la revendication 41, caractérisé en ce que ladite activité glycosyltransférasique est une activité fucosyltransférasique, notamment une activité d' $\alpha$  1,6-fucosyltransférase.

43. Procédé selon l'une quelconque des revendications 39 à 42, caractérisé en ce que lesdites cellules possèdent une activité relative à la synthèse, et/ou au transport de l'UDP-galactose et/ou à l'activité d'une enzyme impliquée dans l'addition de galactose à l'oligosaccharide du site de glycosylation des anticorps diminuée ou déléetée.

44. Procédé selon la revendication 43, caractérisé en ce que ladite enzyme impliquée dans l'addition de galactose est une galactosyltransférase, notamment une  $\beta$  1,4-galactosylatranférase.

45. Procédé selon l'une quelconque des revendications 39 à 44, caractérisé en ce que si à l'étape b), le ratio mesuré est inférieur à 0,6, on fucosyle et/ou on enlève des résidus galactose audit anticorps avant l'étape c).

46. Procédé selon la revendication 45, caractérisé en ce que ladite dé-galactosylation est effectuée par l'addition d'une galactosidase dans le milieu contenant l'anticorps.

47. Procédé selon l'une quelconque des revendications 45 ou 46, caractérisé en ce que l'ajout de résidus fucose est effectué par l'addition d'une fucosyltransférase dans le milieu contenant l'anticorps.

48. Procédé selon l'une quelconque des revendications 39 à 47, caractérisé en ce que ledit anticorps est une immunoglobuline humaine de type IgG.

49. Procédé de préparation selon l'une des revendications 39 à 48, caractérisé en ce que l'anticorps est dirigé contre un CD, marqueur de différenciation des cellules sanguines humaines ou contre un agent pathogène ou sa toxine listée comme étant  
5 particulièrement dangereuse dans les cas de bioterrorisme, notamment *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulium*, *Yersinia pestis*, *Variola major*, *Francisella tularensis*, Filoviruses, Arenaviruses, *Brucella species*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *E.coli*, *Shigella*, *Coxiella burnetii*, la toxine de ricin, *Rickettsia*, Viral encephalitis viruses, *Vibrio cholerae* ou Hantavirus.
- 10
50. Procédé selon l'une quelconque des revendications 39 à 49, caractérisé en ce que ladite activité effectrice est une activité fonctionnelle de type ADCC.
- 15 51. Procédé pour diminuer l'activité d'une composition de molécules immunologiquement fonctionnelles, comprenant l'augmentation du taux de fucose et/ou la diminution du taux de galactose de ladite composition.
- 20 52. Procédé selon la revendication 51, caractérisé en ce que lesdites molécules immunologiquement fonctionnelles sont des anticorps monoclonaux ou polyclonaux.
53. Procédé selon l'une quelconque des revendications 51 ou 52, caractérisé en ce que l'augmentation du taux de fucose est due à une fucosylation de ladite composition par action de une fucosyltransférase.
- 25 54. Procédé selon l'une quelconque des revendications 51 à 53, caractérisé en ce que la diminution du taux de galactose de ladite composition est due à une dé-galactosylation de la composition par action d'une galactosidase.

55. Composition d'anticorps susceptible d'être obtenue à partir d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 39 à 54.

5 56. Utilisation de la composition selon la revendication 55 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention des maladies auto-immunes, des allo-immunisations, notamment le PTI, du rejet de greffe, des allergies, de l'asthme, des dermatites, des urticaires, des érythèmes ou des maladies inflammatoires.

10 57. Procédé pour contrôler l'activité d'une composition de molécules immunologiquement fonctionnelles, comprenant la régulation du ratio taux de fucose / taux de galactose des oligosaccharides du site de glycosylation de la région Fc des anticorps .

1 / 4

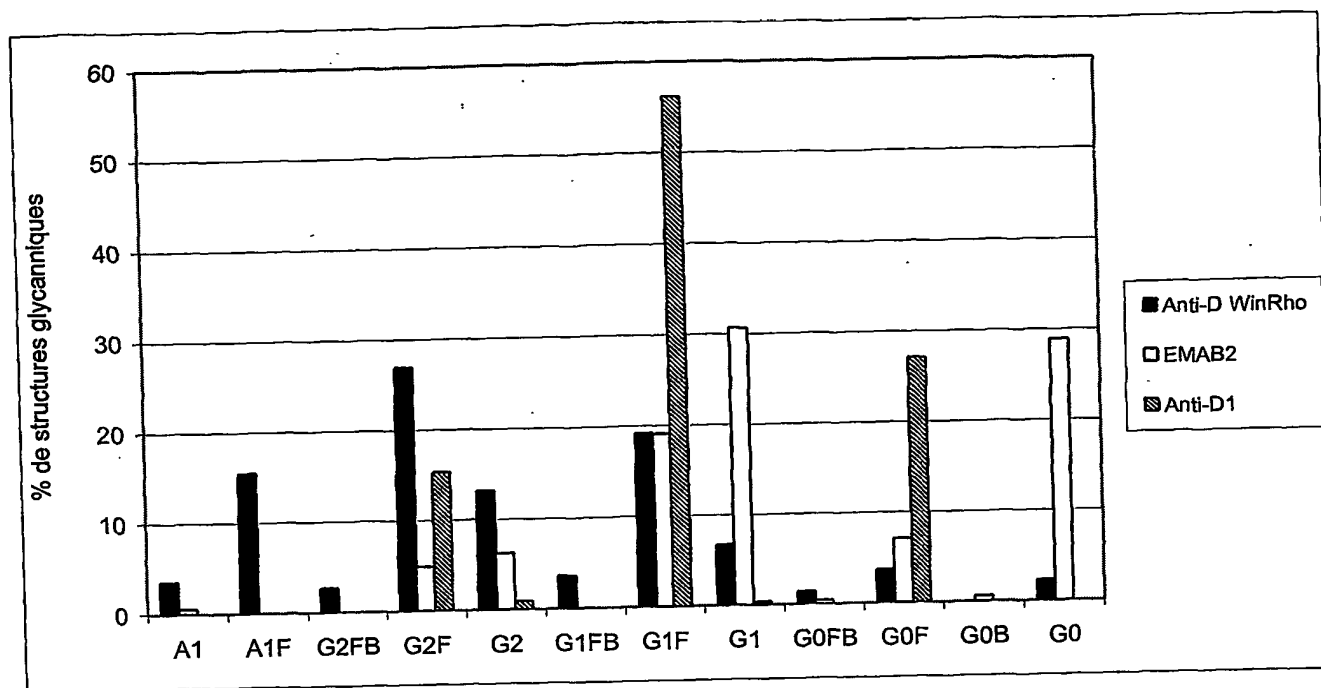


Figure 1

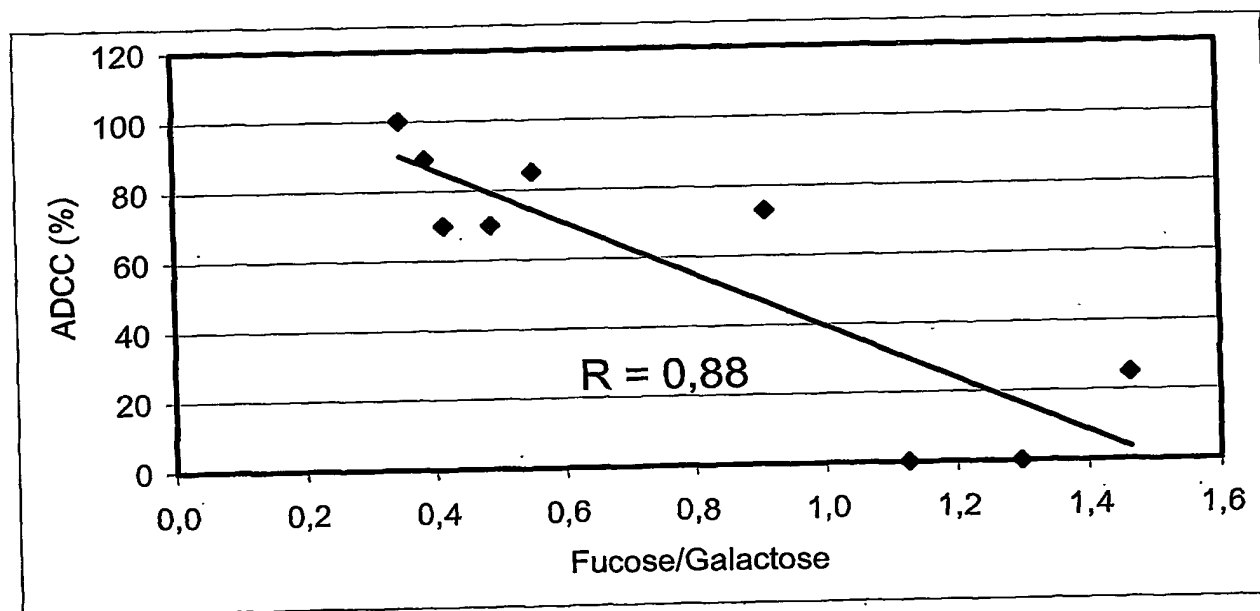


Figure 2



2 / 4

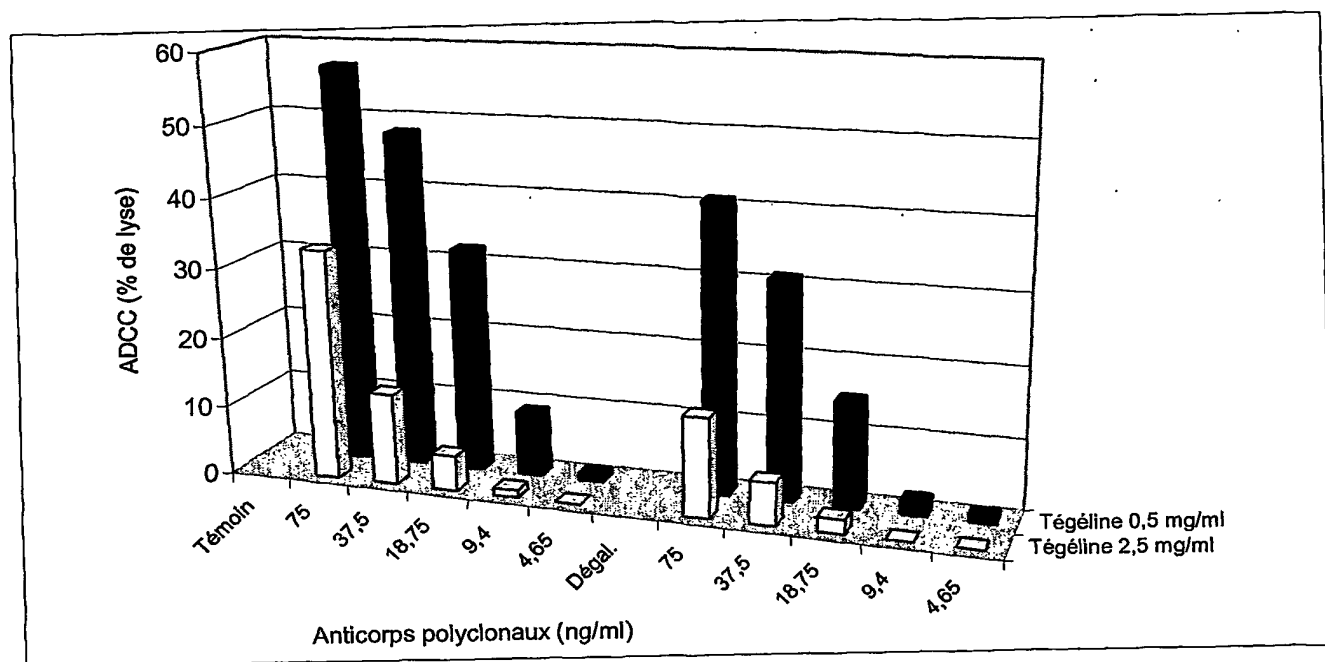


Figure 3

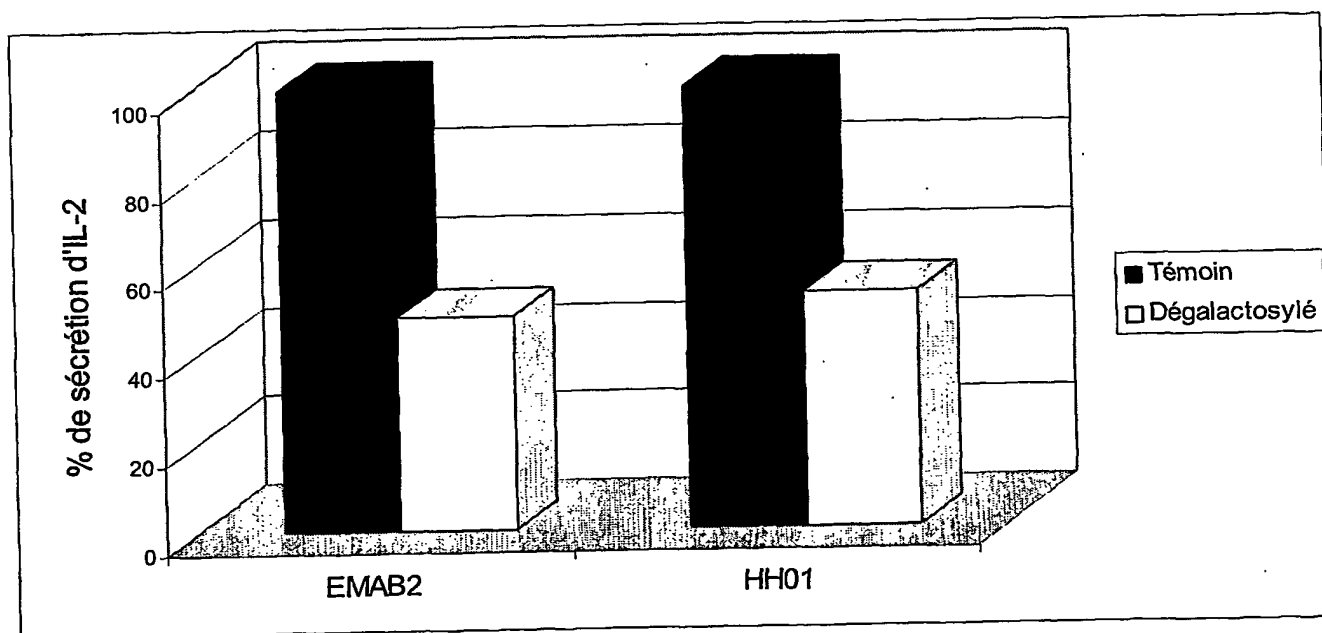


Figure 4

3 / 4

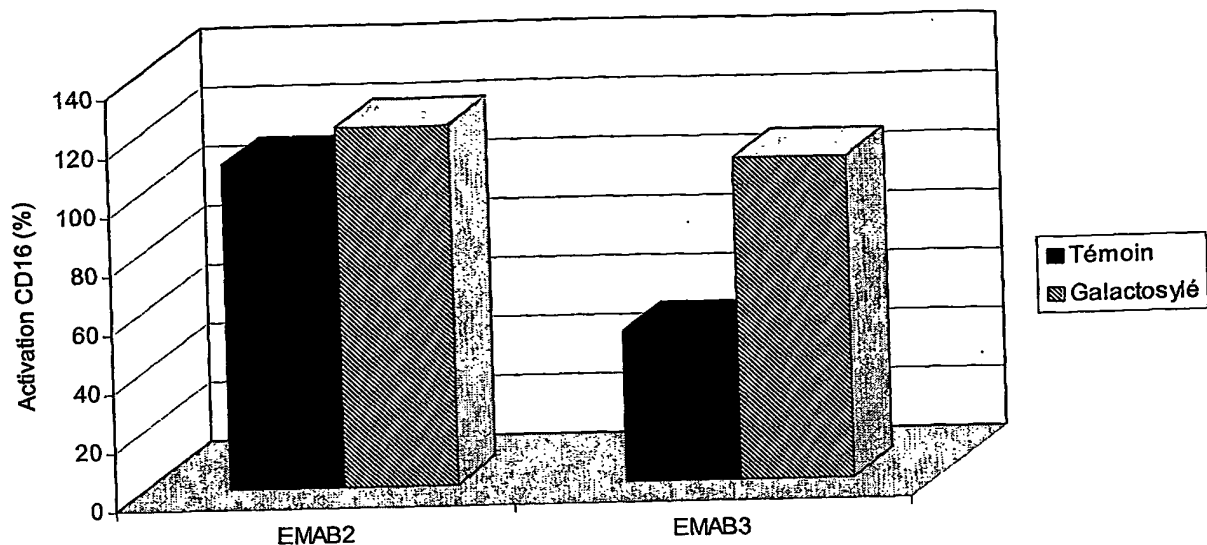


Figure 5

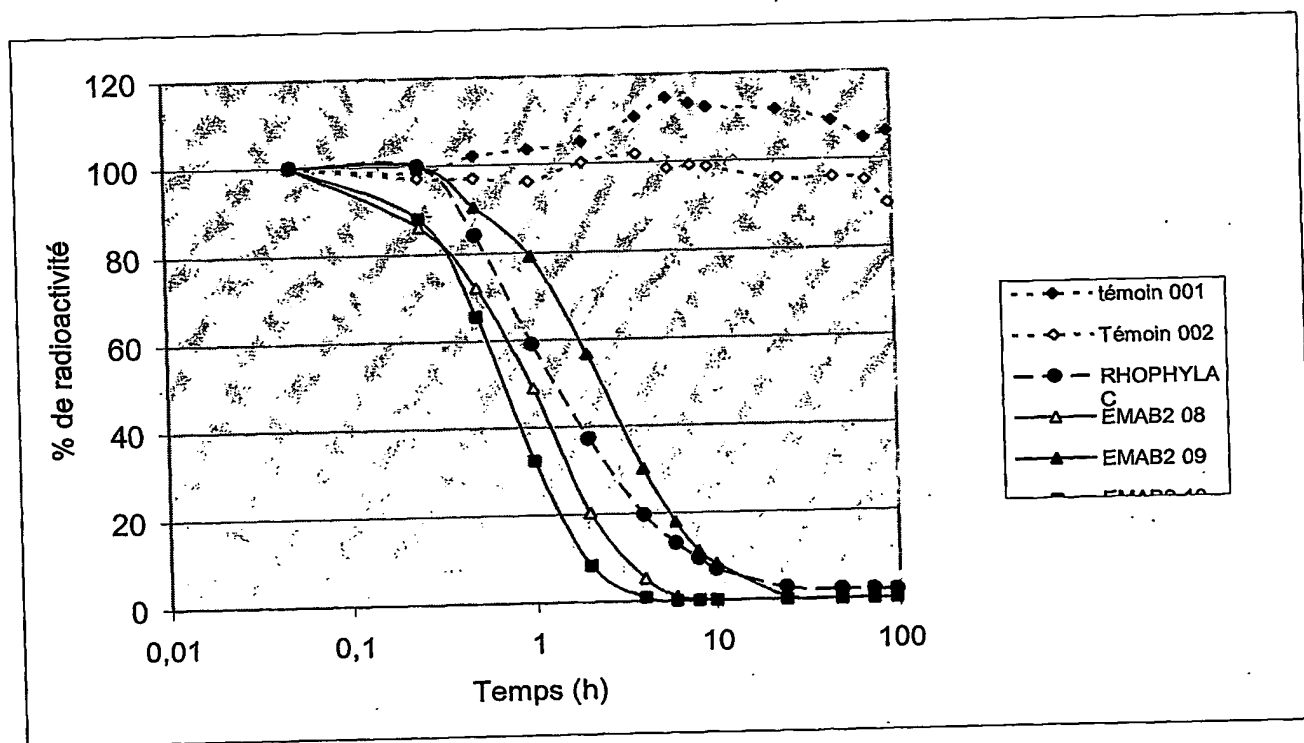


Figure 6

4 / 4

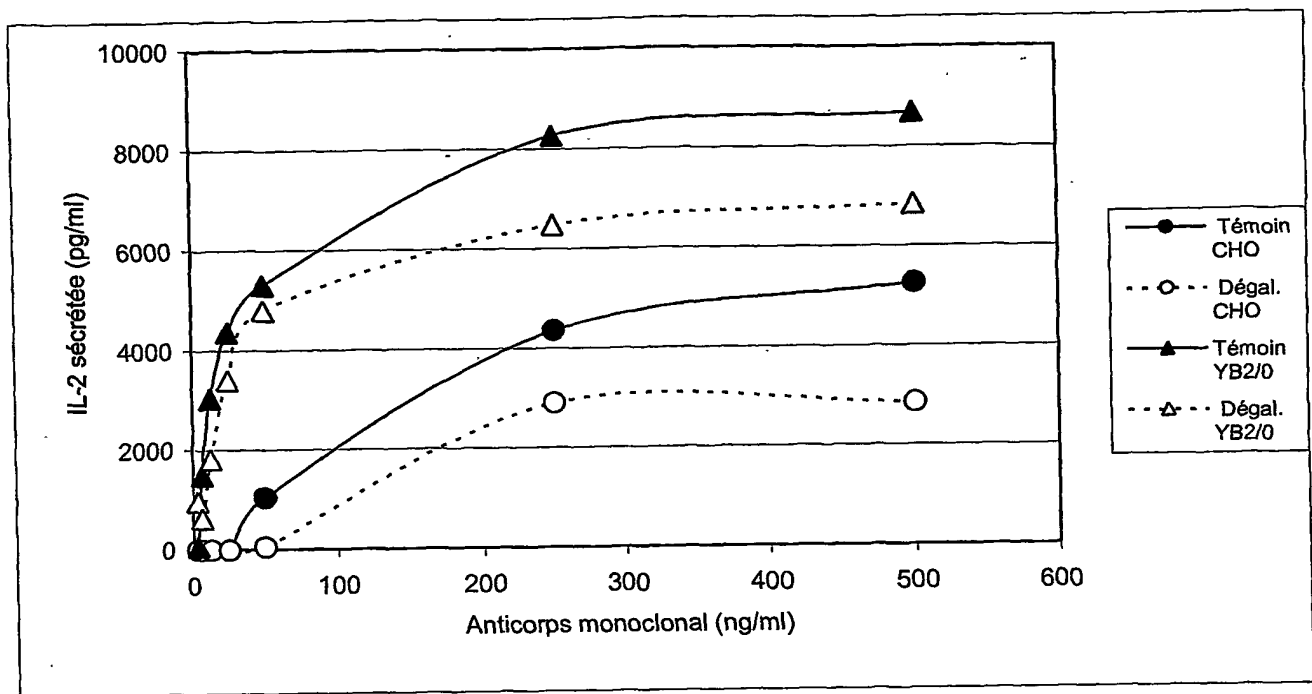


Figure 7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/002686

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/34 C07K16/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06  
C12N5/12 A61K39/395 C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	WO 01/77181 A (GLACET ARNAUD ET AL) 18 October 2001 (2001-10-18)  page 1, line 7 page 3, line 20 - page 5, line 16 table 3	1-25, 27-35, 37-57
Y	----- -/--	36

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

### \* Special categories of cited documents

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 March 2005

Date of mailing of the international search report

05/04/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/002686

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	<p>SHINKAWA T ET AL: "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 278, no. 5, 31 January 2003 (2003-01-31), pages 3466-3473, XP002965857 ISSN: 0021-9258 cited in the application page 3466, left-hand column page 3471, left-hand column, last paragraph - page 3473, left-hand column, paragraph 1</p>	<p>1-25, 27-35, 37-57</p>
Y	-----	36
X	<p>SHIELDS R L ET AL: "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 277, no. 30, 26 July 2002 (2002-07-26), pages 26733-26740, XP002964542 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document</p>	<p>1-25, 27-57</p>
A	<p>WRIGHT A ET AL: "Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 15, no. 1, 1997, pages 26-32, XP004016809 ISSN: 0167-7799 cited in the application page 29, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column</p>	<p>1-25, 27-57</p>
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/002686

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	DAVIES J ET AL: "Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING - COMBINATORIAL CHEMISTRY, WILEY, NEW YORK, NY, US, vol. 74, no. 4, 20 August 2001 (2001-08-20), pages 288-294, XP002285964 ISSN: 0006-3592 cited in the application abstract	1-25, 27-57
A	----- UMANA P ET AL: "ENGINEERED GLYCOFORMS OF AN ANTINEUROBLASTOMA IGG1 WITH OPTIMIZED ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXIC ACTIVITY" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 17, February 1999 (1999-02), pages 176-180, XP002921620 ISSN: 1087-0156 cited in the application page 176, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2; figure 1	1-25, 27-57
A	----- EP 0 316 463 A (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 24 May 1989 (1989-05-24) page 3 -----	14,36

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2004/002686

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: **26**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**see supplemental sheet**
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box II.2

Claim 26

Claim 26, which is dependent on claim 25, relates to a cell characterised in that the mentioned sequence is the sequence NM 001497, AB 024434, NM 003780, BC 053006, XM 242992 or NM 177512. Without any indication as to the meaning of these codes, the subject matter of claim 26 is not clear and thus contravenes PCT Article 6. Owing to the lack of meaning attributed to these codes, no search has been carried out with respect to the subject matter of claim 26.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This is the case whether or not the claims were amended after receipt of the international search report or in the course of the procedure under PCT Chapter II. If the application is pursued in the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search can be carried out in the course of the examination under the EPO (cf. EPO Guidelines, C-VI, 8.5) if the defects that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/002686

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0177181	A	18-10-2001	FR 2807767 A1	19-10-2001
			AU 5485801 A	23-10-2001
			CA 2406033 A1	18-10-2001
			EP 1272527 A2	08-01-2003
			WO 0177181 A2	18-10-2001
			JP 2003534781 T	25-11-2003
			US 2003175969 A1	18-09-2003
EP 0316463	A	24-05-1989	EP 0316463 A1	24-05-1989
			HU 48678 A2	28-06-1989
			PL 271659 A1	16-05-1989
			ZA 8708078 A	16-05-1988

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/002686

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K16/34 C07K16/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06  
C12N5/12 A61K39/395 C07K16/28

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 01/77181 A (GLACET ARNAUD ET AL) 18 octobre 2001 (2001-10-18)	1-25, 27-35, 37-57
Y	page 1, ligne 7 page 3, ligne 20 - page 5, ligne 16 tableau 3  ----- -/--	36



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités.

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*G\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 mars 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/04/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P B 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>SHINKAWA T ET AL: "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 278, no. 5, 31 janvier 2003 (2003-01-31), pages 3466-3473, XP002965857 ISSN: 0021-9258 cité dans la demande page 3466, colonne de gauche page 3471, colonne de gauche, dernier alinéa - page 3473, colonne de gauche, alinéa 1</p>	<p>1-25, 27-35, 37-57</p>
Y	-----	36
X	<p>SHIELDS R L ET AL: "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 277, no. 30, 26 juillet 2002 (2002-07-26), pages 26733-26740, XP002964542 ISSN: 0021-9258 cité dans la demande le document en entier</p>	<p>1-25, 27-57</p>
A	<p>WRIGHT A ET AL: "Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 15, no. 1, 1997, pages 26-32, XP004016809 ISSN: 0167-7799 cité dans la demande page 29, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	<p>1-25, 27-57</p>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/002686

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
A	<p>DAVIES J ET AL: "Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII"</p> <p>BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING - COMBINATORIAL CHEMISTRY, WILEY, NEW YORK, NY, US, vol. 74, no. 4, 20 août 2001 (2001-08-20), pages 288-294, XP002285964 ISSN: 0006-3592 cité dans la demande abrégé</p>	1-25, 27-57
A	<p>-----</p> <p>UMANA P ET AL: "ENGINEERED GLYCOFORMS OF AN ANTINEUROBLASTOMA IGG1 WITH OPTIMIZED ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXIC ACTIVITY"</p> <p>NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 17, février 1999 (1999-02), pages 176-180, XP002921620 ISSN: 1087-0156 cité dans la demande page 176, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 2; figure 1</p>	1-25, 27-57
A	<p>-----</p> <p>EP 0 316 463 A (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 24 mai 1989 (1989-05-24) page 3</p> <p>-----</p>	14,36

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR2004/002686

## Cadre II Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> 26 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir FEUILLE ANNEXÉE PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre III Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre II.2

Revendications nos.: 26

La revendication 26, dépendante de la revendication 25 se rapporte à une cellule caractérisée en ce que ladite séquence est la séquence NM 001497, AB 024434, NM 003780, BC 053006, XM 242992 ou NM 177512. Sans précision concernant la signification des ces codes l'objet de la revendication 26 n'est pas clair, ce qui n'est pas conforme à l'article 6 PCT. L'absence de signification de ces codes a pour conséquence que l'objet de la revendication 26 n'a pas été recherché.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II. Si la demande devait être poursuivie dans la phase régionale devant l'OEB, il est rappelé au déposant qu'une recherche pourrait être effectuée durant la procédure d'examen devant l'OEB (voir Directive OEB C-VI, 8.5) à condition que les problèmes ayant conduit à la déclaration conformément à l'Article 17(2) PCT aient été résolus.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2004/002686

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0177181 A	18-10-2001	FR 2807767 A1	19-10-2001
		AU 5485801 A	23-10-2001
		CA 2406033 A1	18-10-2001
		EP 1272527 A2	08-01-2003
		WO 0177181 A2	18-10-2001
		JP 2003534781 T	25-11-2003
		US 2003175969 A1	18-09-2003
EP 0316463 A	24-05-1989	EP 0316463 A1	24-05-1989
		HU 48678 A2	28-06-1989
		PL 271659 A1	16-05-1989
		ZA 8708078 A	16-05-1988